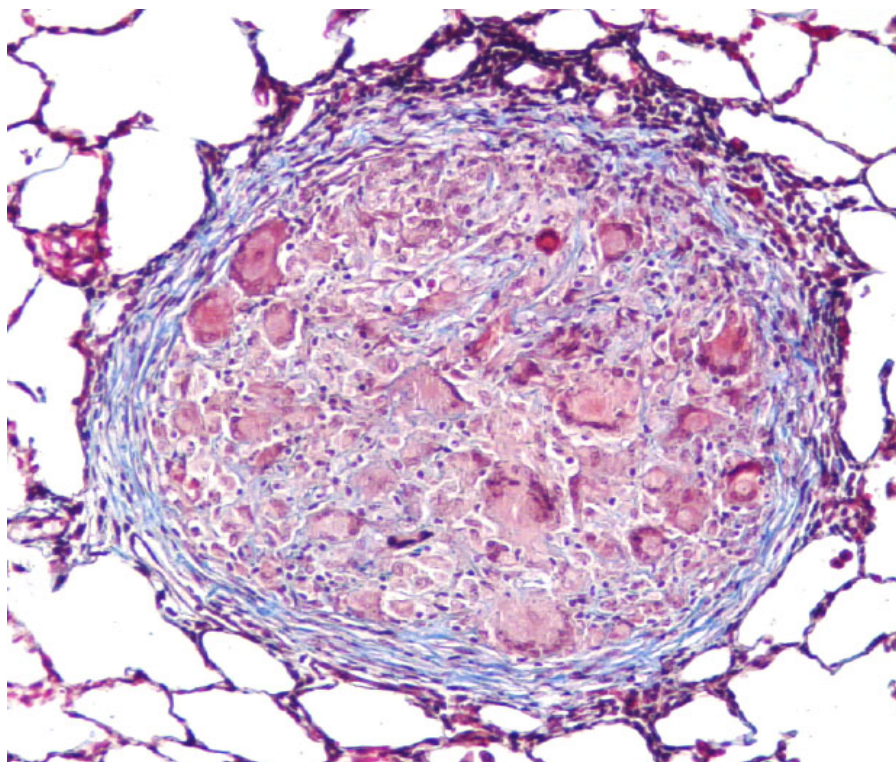


Treball de fi de màster

Estudi de l'efecte de la vacunació amb BCG en el desenvolupament de la càpsula fibrosa en granulomes tuberculosos pulmonars en un model de Tuberculosi experimental en ovella



Autor: Andreu Masdefiol Garriga

Director: Enric Vidal Barba

Tutor: Francesc Accensi Alemany

Màster en Zoonosi i Una Sola Salut (One Health). Curs 2016-2017

Andreu Masdefiol Garriga
(autor)

Enric Vidal Barba
(director)

Francesc Accensi Alemany
(tutor)

Índex

0. Llistat d'acrònims.....	1
1. Resum	2
2. Introducció	3
2.1 La tuberculosi	3
2.1.1 La TB en persones	3
2.1.2 La TB en animals	5
2.1.2.1 La TB en bovins.....	6
2.1.2.2 La TB en petits remugants.....	8
2.1.2.3 La TB en reservoris silvestres.....	8
2.1.3. Diagnòstic	8
2.1.3.1 IDT.....	8
2.1.3.2 Serologia.....	10
2.1.3.3 Interferó gamma.....	10
2.1.3.4 AP	10
2.1.3.5 Cultiu microbiològic i PCR.....	12
2.1.4. Control de la malaltia	12
2.1.5. Patogènia de la TB.....	13
2.1.5.1 Tuberculosi pulmonar.....	13
2.1.5.2 Latència, reactivació i tuberculosi secundària.....	16
2.1.5.3 Manifestacions extrapulmonars.....	16
3. Model experimental de TB en ovella.....	17
4. Estudi experimental.....	18
4.1 Hipòtesi	18
4.2 Objectiu	18
4.3 Materials i mètodes	18
4.4 Resultats.....	24
4.5 Discussió.....	34
4.6 Conclusions	38
5. Agraïments	38
6. Bibliografia.....	39

0.Llistat d'acrònims

AP: Anatomia Patològica

APC: Cèl·lules presentadores d'antigen

BCG: Bacil de Calmette-Guerin

CTRL: Control

DTH: Hipersensibilitat de tipus retardat

ECDC: European Center of Disease Control and Prevention. Centre Europeu de Control i Prevenció de Malalties

EFSA: Autoritat Europea de Seguretat Alimentària

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

IDT: Intradermotuberculinització

IL: Interleuquina

IRTA-CReSA: Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentàries-Centre de Recerca en Sanitat Animal.

HIV: Virus de la immunodeficiència humana

MDR: Multi-drug resistance. Resistència a més d'un fàrmac

OIE: Organització Mundial de Sanitat Animal

OTF: Officially Tuberculosis Free

PCR: Prova de la reacció en cadena de la polimerasa

PPD: Derivat Proteic Purificat

OMS: Organització Mundial de la Salut

RNIs: Espècies reactives de nitrogen

ROIs: Espècies reactives d'oxigen

SDPV: Servei de Diagnòstic de Patologia Veterinària

SIDA: Síndrome d'immunodeficiència adquirida

TB: Tuberculosi

TFN- α : Factor de necrosi tumoral α

TGF-B: Factor de creixement transformant β

XDR: Extensively drug resistance. Resistència àmplia a fàrmacs

ZN: Ziehl-Neelsen

1. Resum

L'objectiu d'aquest estudi va ser evidenciar diferències, pel que fa a la càpsula fibrosa, entre els granulomes petits d'animals vacunats amb BCG (posteriorment inoculats amb *M. caprae*) i d'animals control (també inoculats amb *M. caprae*) mitjançant la tinció tricròmica de Masson, que permetessin explicar l'evolució diferent de la lesió tuberculosa en cada grup. Es van utilitzar 12 animals, 6 vacunats i 6 no vacunats (controls), en la infecció experimental, i a partir d'aquests es van obtenir els talls histològics de parènquima pulmonar, per a l'avaluació de la càpsula dels granulomes tuberculosos (o tubercles). Per a la realització d'aquesta es van tenir els talls amb la tinció de Masson i es va avaluar qualitativament la presència de càpsula i la localització dels granulomes i semiquantitativament el gruix de la càpsula i la presència d'estroma, dividint els granulomes en dos grups en funció de la seva mida: de menys d'1 mm de diàmetre i d'1 a 5mm de diàmetre. Es va observar major grau de no encapsulament en granulomes d'animals no vacunats que en vacunats, tant en granulomes de menys d'1 mm de diàmetre com en granulomes d'1 a 5mm de diàmetre. A nivell individual es va observar que hi havia 3 dels 6 animals control que no estaven encapsulant la majoria dels granulomes d'entre 1 i 5mm de diàmetre, mentre que en el grup de vacunats només hi havia un animal poc encapsulador. Pel que fa a gruix de càpsula, es va observar un fenomen semblant, amb els animals vacunats encapsulant amb més capes els seus granulomes que els controls. Quant a la presència d'estroma, es va observar que els animals BCG en tenien més en els granulomes petits (<1mm) que els animals control, mentre que en els grans no hi va haver diferències entre grups. Finalment, pel que fa a la localització, es va observar que independentment del tractament rebut pels animals, els granulomes propers a estructures riques en fibròcits (pleura, septes, vasos sanguinis, bronquis) estaven més encapsulats que els que estaven enmig del parènquima pulmonar. Hi va haver diferències individuals entre animals del mateix grup, en ambdós grups, amb alguns animals molt encapsuladors i amb molt estroma i d'altres que no van encapsular gens. La vacuna BCG promouria la fibrosi dels granulomes i aquest fet ajudaria a contenir millor les lesions, tot i que hi hauria altres mecanismes de control del granuloma.

2. Introducció

2.1 La tuberculosi

La tuberculosi és una malaltia infecciosa granulomatosa crònica que afecta una gran varietat d'espècies animals terrestres i marines, domèstiques i salvatges, i l'espècie humana.

Els bacteris causants de la malaltia formen part del gènere *Mycobacterium* i són bacils gram positius, aerobis estrictes, àcid-alcohol resistent, immòbils i no esporulats.¹

Les espècies de micobacteris que causen la tuberculosi s'engloben dins l'anomenat complex *Mycobacterium tuberculosis* i són les següents: *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.africanum*,² *M.caprae*, *M.orgys*, *M.microti*, *M.canetii*,³ *M.avium ssp avium*,⁴ *M.suricattae*, *M.pinnipedii* i *M.mungi*. A excepció de les tres últimes, *M.suricattae*, *M.pinnipedii* i *M.mungi*,³ totes poden infectar i produir tuberculosi a les persones.

2.1.1 La TB en persones

La tuberculosi humana és una de les malalties més antigues que es coneixen en les persones⁵⁻⁷ i està causada principalment per *Mycobacterium tuberculosis*, tot i que també són zoonòtiques les espècies *M.bovis*, *M.africanum*, *M.caprae*, *M.orgys*, *M.microti*, *M.canetii* i *M.avium ssp avium*.

La seva aparició en l'espècie humana data del Neolític, cap a l'any 9000 aC,⁶ i s'explicaria per la domesticació dels bòvids, que haurien transmès el micobacteri a les persones.^{5,7} La tuberculosi animal seria molt més antiga, i hauria aparegut fa uns 20000-35000 anys.⁵ Quant a la seva propagació per tot el món, Maradona Hidalgo al seu llibre *Tuberculosis. Historia de su conocimiento* l'explica per dos fets que es van produir a les societats neolítiques d'arreu: acumulació d'un nombre important de persones en un mateix lloc i estret contacte (domesticació) d'aquestes amb animals domèstics.⁶

A partir d'aquest moment, doncs, se suposa que hom ha conviscut amb la malaltia. Hi ha evidències de la presència de la tuberculosi al llarg de la història, des de societats arcaiques com l'antic Egipte, del qual s'han trobat mòmies de més de 4.000 anys d'antiguitat amb un quadre de tuberculosi vertebral (o mal de Pott)⁷ o la Grècia clàssica, de la qual daten sinònims de la malaltia que han fet fortuna com tisi o consumpció (en referència, ambdós, al quadre clínic d'extrem esgotament i desgast físic que provocava la malaltia en els seus estadis més avançats)⁵ fins al món contemporani.

Dos moments culminants de l'estudi de la tuberculosi foren els protagonitzats pel microbiòleg Robert Koch: en primer lloc, la conferència que va fer sobre l'etiologia de la tuberculosi (vigent des

d'aleshores) l'any 1882 a l'Institut de Fisiologia de la Universitat de Berlin⁶ i, en segon lloc, la creació, l'any 1890, d'una prova diagnòstica que actualment encara és àmpliament utilitzada, la tuberculina.⁵ Una tercera fita en la història de la tuberculosi fou la creació, a partir de *M.bovis*, de la primera vacuna contra la malaltia el 1919, anomenada BCG o Bacil Calmette-Guerin.⁸ Cal dir que la BCG és, des d'aleshores, l'única vacuna antituberculosa que existeix. És per això que, tot i les dades contradictòries pel que fa la seva eficàcia protectora, se segueix administrant a uns 100 milions de nens cada any.⁹

Al tractament eficaç s'hi va arribar a mitjan segle XX, quan es creà la estreptomina a partir del fong *Streptomyces griseus* (1944) i, sobretot, quan es desenvolupà i popularitzà la isoniazida (1952), que ràpidament va convertir la tuberculosi en una malaltia curable en la major part dels casos.⁵

Actualment la tuberculosi humana és una malaltia en clar descens, tot i que segueix ben present arreu del món; pràcticament tots els països del planeta en tenen casos, encara que certament és una malaltia circumscrita a les regions menys desenvolupades del món,¹⁰ com l'Àfrica subsahariana i el sud-est asiàtic (**Fig.1**). L'any 2015, el 85% de les 1.800.000 persones que s'estima que van morir a causa de la tuberculosi vivien a alguna d'aquestes dues regions.¹¹ Especialment sagnant és el cas del continent africà, que a banda de ser el que més casos de tuberculosi té, també és el que més en té de SIDA/HIV (un 12% -37% a l'Àfrica- dels morts per TB són infectats pel VIH).¹²

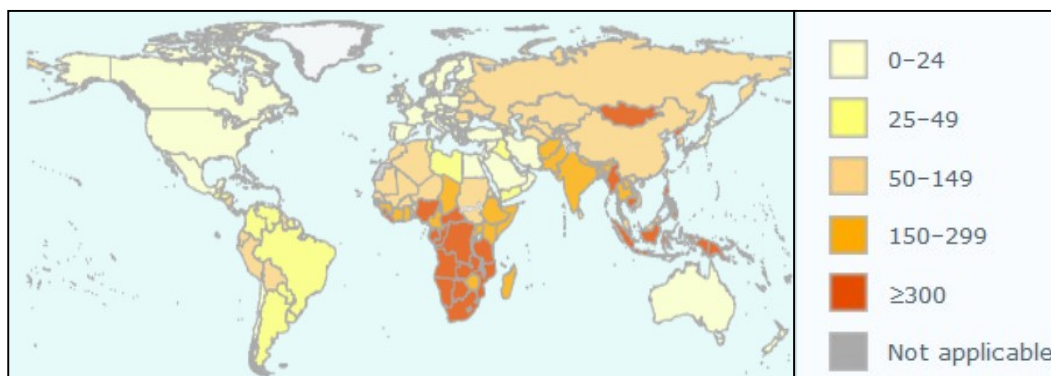


Figura 1: Incidència per països estimada de tuberculosi humana per cada 100.000 habitants durant l'any 2015 (extret del *Global Tuberculosis Report 2016* de l'OMS)

A Espanya la tuberculosi humana és una malaltia en retrocés; la incidència per cada 100.000 habitants i per any ha passat de prop de 22 l'any 2000 a 12 l'any 2015, i la mortalitat per cada 100.000 habitants i per any en el mateix període de temps s'ha reduït a la meitat, de 1,5 a 0,7.¹³ En percentatge de nombre de casos, Espanya és el país de la Unió Europea que més ha reduït la presència de la malaltia any rere any des de 2010 fins a 2015 (un 38,3%) i ha passat dels 6.798 casos

que tenia l'any 2010 als 4191 de l'any 2015.¹⁴ Tot i així, els nivells de la malaltia superen els de països veïns com França, Alemanya o Itàlia.¹⁵

Catalunya és el territori de l'estat espanyol amb més casos de tuberculosi, segons les dades més recents (de 2014), amb un 22,5% del total.¹⁵ De tots els casos detectats a Catalunya, un 1,4% foren causats per micobacteris zoonòtics (1,1% per *M.bovis* i 0,28% per *M.caprae*)¹⁶. Al seu torn, Barcelona és la regió sanitària de Catalunya que més casos registra, amb un 66% del total de casos el 2014 i un 68% el 2015.¹⁶

2.1.2 La TB en animals

2.1.2.1 La TB en bovins

La tuberculosi al bestiar boví està principalment causada per *M.bovis*, l'agent etiològic principal de la malaltia anomenada tuberculosi bovina² que tot i tenir en el bestiar boví el seu veritable hoste¹⁷ s'ha aïllat i descrit en una gran varietat de mamífers terrestres i marins.¹⁸ També causen tuberculosi en boví *M. tuberculosis*¹⁹ i *M.caprae*.²⁰

La tuberculosi bovina és una malaltia infecciosa crònica que es manifesta a llarg termini (mesos, anys) i que pot arribar a causar la mort, tot i que també és possible que no s'arribi a manifestar mai i romangui com a infecció latent²¹. La via d'infecció habitual i la més efectiva és l'aerògena,²² tot i que els vedells i l'espècie humana també poden infectar-se per ingestió de llet crua d'animals (bovins) infectats. Altres vies menys habituals són fòmites, ingestió de pastures o aigua contaminada, transmissió vertical²³ i ingestió de restes de canals bovines contaminades.²⁴

La via d'infecció determina la forma clínica que manifestarà l'animal.²⁵ Així, la inhalació del bacil produeix l'anomenada tuberculosi pulmonar, que es caracteritza primerament per l'aparició del complex primari respiratori²³. El complex primari respiratori, també conegut com a complex de Ghon, és una lesió dual de manifestació pulmonar, en forma de petit nòdul broncopneumònic de color blanquinós,²³ i que també involucra els nodes limfàtics locals, amb l'aparició de granulomes (habitualment encapsulats) que contenen pus i que poden calcificar-se²¹. Si l'animal no és capaç de retenir la infecció al complex primari, aquesta pot escampar-se pel pulmó i formar més nòduls, o generalitzar-se pels vasos limfàtics i sanguinis afectant qualsevol òrgan del cos¹⁹ i donant lloc a la tuberculosi generalitzada o miliar, en la qual veiem nodulacions (o tubercles) a diferents òrgans, com el ronyó, el fetge i la melsa²³ i nodes limfàtics associats.² D'altres localitzacions del bacil són les meninges, cavitats seroses i glàndula mamària.²³

En cas d'ingestió, el quadre patològic és principalment intestinal, amb augment de mida dels nodes

limfàtics mesentèrics, que a més presenten nodulacions granulomatoses similars a les dels nodes limfàtics respiratoris,²¹ tot i que també pot acabar generalitzant-se i donar lloc a la tuberculosi miliar.²³

La simptomatologia de la tuberculosi sol ser molt inespecífica i moltes vegades no es manifesta fins que l'animal està en un estadi molt avançat.² Signes clínics habituals són debilitat, pèrdua d'apetit i de pes, febre fluctuant, limfadenomegàlia, diarrea,¹⁸ apetit capriciós i davallada de la producció,⁴ normalment acompanyats de clínica respiratòria com tos crònica. En cas d'afectació pulmonar molt severa, pot presentar-se dispnea, taquipnea, crepitacions i sibilàncies pulmonars.²¹ Altres manifestacions menys habituals són problemes reproductius, tals com metritis, vaginitis, avortaments, infertilitat i mamitis.²¹

La tuberculosi bovina és una malaltia de declaració obligatòria a l'OIE que ha estat erradicada d'alguns països com Noruega, Finlàndia, Suècia, Dinamarca, Letònia, Estònia, Canadà, Jamaica, Singapur, Austràlia, Islàndia, Barbados, Israel.²⁶ Als països desenvolupats té una incidència mínima, atesa l'àmplia implantació dels programes d'erradicació²⁷ basats en testatge i sacrifici de positius. A tall d'exemple, és molt il·lustradora la Figura 2, on s'observa que la tuberculosi bovina és una malaltia que és a prop de desaparèixer a la pràctica totalitat de l'Europa central (**Fig.2**), on la majoria d'estats són OTF, és a dir, que en els últims 6 anys han tingut una prevalença de TB en ramats inferior al 0,01%.²⁸ Als països en desenvolupament, en canvi, s'estima que la incidència de la malaltia està augmentant, en part a causa de l'absència de programes d'erradicació.²⁹

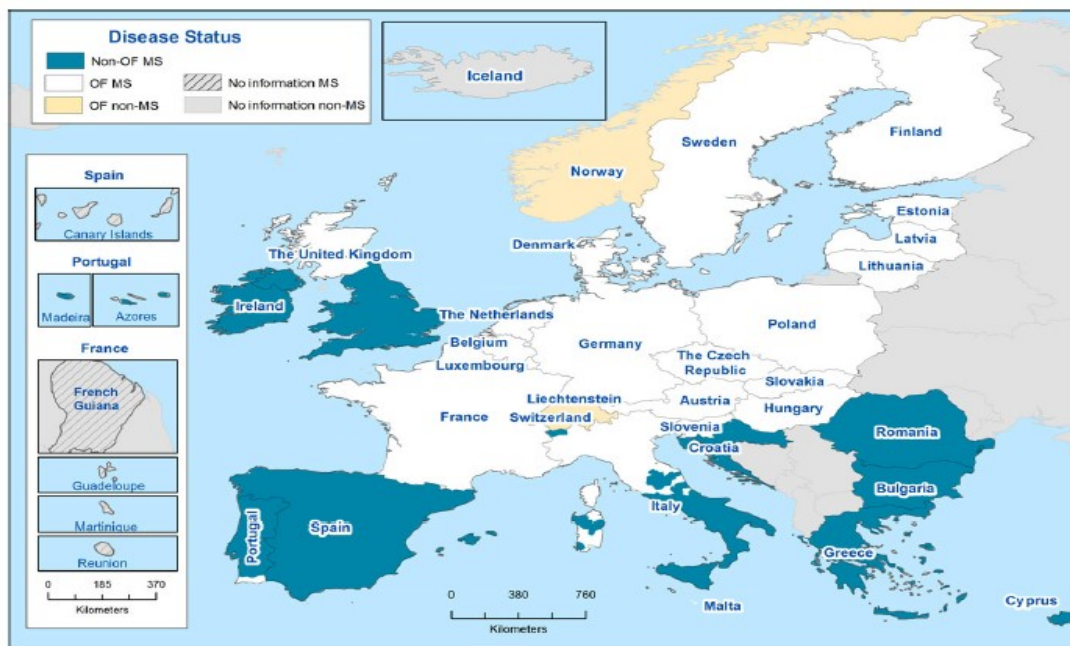


Figura 2: Prevalença màxima de tuberculosi bovina en ramats a les comarques espanyoles, l'any 2015. (extret de la pàgina de Tuberculosi bovina del web del Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente)

A Espanya, les dades més recents (2015) indiquen la tuberculosi bovina segueix present a totes les comunitats autònomes (excepte les Illes Canàries), amb especial atenció a Extremadura i les províncies més occidentals de Castella-la Manxa i Andalusia (**Fig.3**).

Pel que fa a Catalunya, durant l'any 2015 només 8 de les 42 comarques van tenir una prevalença de tuberculosi superior a 0.

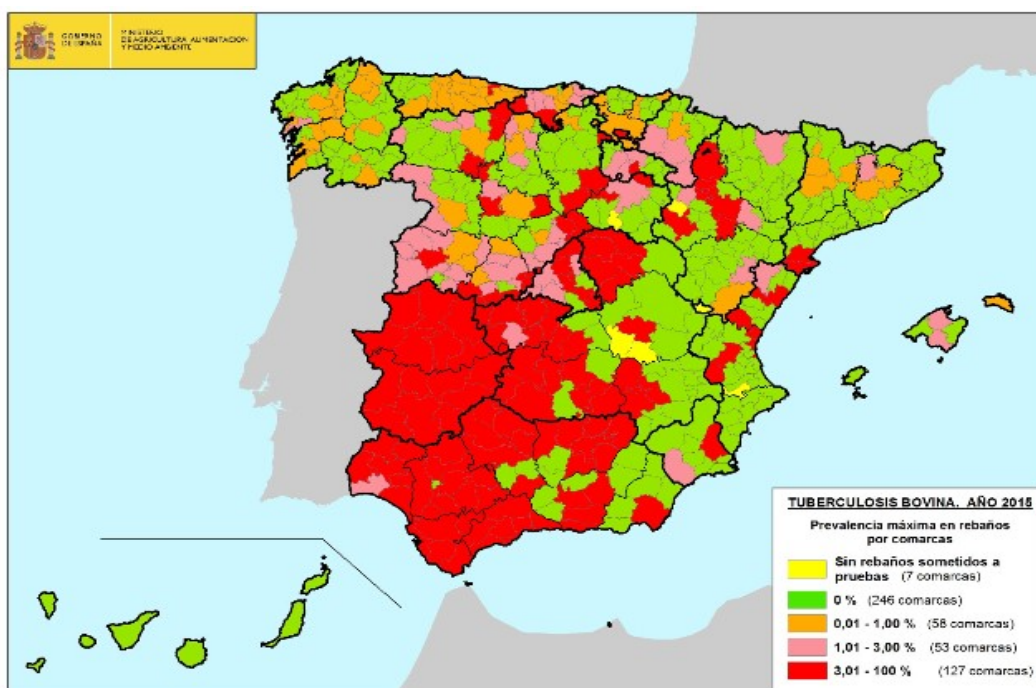


Figura 3: Estatus de la tuberculosi bovina a Europa l'any 2015. (extret de l'EFSA Journal 2016)

2.1.2.2. La TB en petits remugants

La tuberculosi en petits remugants és una malaltia que sol estar causada per *M.bovis* i *M.caprae*,^{30,31} tot i que també s'ha observat malaltia causada per *M.avium ssp avium*^{19,32,33} i *M.tuberculosis*,^{2,34} La presència de la malaltia en l'ovella i la cabra s'atribueix principalment al contacte d'aquestes espècies amb ramats de bovins infectats, alhora que sembla clar que els petits remugants poden tenir un paper important en la transmissió a l'espècie bovina.^{35,36} La manifestació de la malaltia en petits remugants és molt semblant a la de l'espècie bovina.²⁹

La tuberculosi en petits remugants no apareix a la llista de malalties de l'OIE del 2017, i, en conseqüència, tampoc està subjecta a cap campanya d'erradicació. Aquest fet, unit a l'evidència científica que assenyalava els petits remugants com a potencials mantenidors i fins i tot reintroductors de la malaltia en boví,^{35,36} fa necessària la recerca de mètodes de control de la tuberculosi en aquests animals.

2.1.2.3. La TB en fauna silvestre

La tuberculosi és una malaltia present a la fauna silvestre, que pot infectar una gran varietat d'espècies de les cinc classes de vertebrats: aus,³⁷ amfibis,^{38,39} peixos,^{40,41} mamífers,³⁷ i rèptils.⁴²

A Europa, les espècies que més preocupen com a potencials reservoris silvestres i reintroductors de la malaltia (per *M.bovis*) a la fauna domèstica són el porc senglar, del qual es reporten prevalences altes de tuberculosi bovina arreu d'Europa⁴³ els cèrvids (sobretot el cérvol comú i la daina) i el teixó.⁴³⁻⁴⁵ A Espanya i Catalunya es considera que, sobretot el senglar, tot i que també els cèrvids, són les espècies que podrien mantenir la tuberculosi a la natura.^{43,46-48} Diferents estudis han xifrat la prevalença de tuberculosi (causada per *M.bovis*) en senglar en un 46-52%,^{49,50} en daina en un 18% i en cérvol comú en un 27% en algunes parts d'Espanya.⁴⁶

2.1.3. Diagnòstic

2.1.3.1. IDT

La IDT és la tècnica per diagnosticar la tuberculosi utilitzada a les granges (tant de boví com de petits remugants) de manera rutinària i alhora l'oficial a l'hora d'obtenir qualificacions sanitàries.⁵¹ N'existeixen dues variants: la IDT simple o IDTBS, que té per objectiu detectar la tuberculosi en els animals,⁵² i la IDT comparada o IDTBC, que és una prova més específica que permet el diagnòstic diferencial amb altres micobacteris,⁵¹ principalment *M.avium ssp paratuberculosis*. Les dues tenen un fonament immunològic comú i una metodologia molt semblant.

El fonament immunològic del test és l'avaluació de la reacció d'hipersensibilitat retardada (DTH) o

de tipus IV-mediada per cèl·lules,³¹ protagonitzada pels limfòcits T CD4 i CD8 i els macròfags, a més de les diferents citoquines proinflamàtores que secreten.⁵³ La tècnica consisteix en la injecció intradèrmica de l'anomenat PPD, que és un antigen específic de micobacteris, i la posterior detecció de reacció local (en forma d'inflor) passades 72 hores.¹⁸ L'animal que hagi estat en contacte amb el micobacteri anteriorment mostrarà una reacció inflamatòria apreciable (fruit de l'acció inflamatòria dels limfòcits i macròfags), mentre que l'animal que no hi hagi estat mai no tindrà reacció aparent.⁵²

En la IDTBs, inoculem el PPD boví, que és un antigen específic de micobacteris del complex *Mycobacterium tuberculosis*,⁵⁴ esperem 72 hores i mesurem novament el gruix del plec de pell. La magnitud de l'augment de gruix del plec i l'eventual aparició de símptomes determinaran el diagnòstic:

-Un animal negatiu és aquell que no mostra signes clínics com edema difús o estès, exsudat, necrosi, dolor o inflamació dels vasos o nodes limfàtics de la zona, i a més té un augment del gruix del plec de pell inferior a 2 mil·límetres.

-Un animal positiu és aquell que sí que mostra signes clínics i/o que té un augment del gruix del plec de pell de més de 4 mil·límetres.

-Queden com a dubtosos aquells animals sense simptomatologia i amb un augment d'entre 2 i 4 mil·límetres del gruix del plec de pell. En aquest cas, els animals s'aïllaran i se'ls repetirà la prova 42 dies després. En cas de no sortir negativa, es consideraran positius.⁵¹

Pel que fa a la IDTBc, després d'inocular el PPD boví, a una zona propera inoculem el PPD aviar. Així:

si la reacció al PPD boví és negativa o és dubtosa o positiva però igual o inferior a una reacció dubtosa o positiva al PPD aviar, i sempre que no tingui signes clínics, l'animal es considera negatiu a la prova i no infectat per un micobacteri tuberculós.¹⁸

-Si la reacció al PPD boví és superior en més de 4 mil·límetres a la reacció al PPD aviar o mostra signes clínics, l'animal es considera positiu.¹⁸

-Queden com a dubtosos aquells animals que no mostren signes clínics i en els quals la reacció al PPD boví és d'1 a 4 mil·límetres superior a la reacció al PPD aviar⁵¹.

Com s'ha dit, la principal utilitat de la prova és que ens permet distingir si els animals estan infectats per micobacteris tuberculosos o d'altres, principalment *M.avium ssp paratuberculosis*. Aquest micobacteri és el causant d'una malaltia que també afecta bovins i petits rumiants anomenada Paratuberculosi o malaltia de Johne⁵⁵ de curs crònic i simptomatologia tardana i inespecífica com

aprimament, letargia, emaciació, caquèxia i diarrea^{56,57} i la vacunació de la qual fa interferència en el diagnòstic de la tuberculosi.¹⁸

2.1.3.2. Serologia

L'estudi serològic és una tècnica que no és de rutina a les granges⁵⁴ i que s'utilitza més com a complement de les tècniques de detecció de resposta cel·lular (com la IDT)⁵⁸, tot i que es contempla com a alternativa a les proves tradicionals en l'estudi de la presència de la malaltia en determinades poblacions com la fauna salvatge⁵⁹ i els animals de zoo¹⁸, en les quals no és factible fer altres tipus de proves.

Una de les proves serològiques que s'utilitza és la detecció d'anticossos per mitja d'ELISA. Aquesta tècnica té alguns avantatges respecte de la IDT, com per exemple que és capaç de detectar animals anèrgics⁶⁰, és a dir, infectats però negatius a les proves rutinàries, és senzilla de fer i que els resultats s'obtenen en poc temps⁶¹, tot i que té menys sensibilitat, atès que la resposta humoral enfront la tuberculosi és tardana i irregular¹⁸, i menys especificitat que la IDT⁶².

2.1.3.3. Interferó gamma

El test de l'interferó gamma és una prova complementària a la IDT que consisteix en extreure sang de l'animal i avaluar, *in vitro*, la immunitat cel·lular de l'individu.¹⁸

La base immunològica de la prova és la reactivitat dels limfòcits enfront antígens, que s'avalua mesurant la presència de l'interferó gamma, una citoquina inflamatori que secreten els limfòcits quan reconeixen un antigen.⁶¹

Pel que fa a la metodologia de la prova, un cop recollida sang de l'animal, se separa en dos grups, un dels quals s'estimula amb PPD boví i l'altre a PPD aviar, durant 18-24 hores.⁵⁴ Transcorregut aquest temps, es recull el sèrum de cadascun dels dos grups i es fa un ELISA de detecció d'interferó gamma.⁵¹ Es comparen els resultats dels dos ELISA i es fa el diagnòstic definitiu.

L'ús que es dona a aquesta tècnica és doble: d'una banda, permet augmentar la sensibilitat de la Intradermotuberculinització i, de l'altra, permet augmentar-ne l'especificitat.⁶³ S'utilitza en ramats ja confirmats per assegurar l'eliminació de tots els positius.

2.1.3.4. AP

L'observació macroscòpica i microscòpica de teixits i òrgans és una tècnica que té el seu àmbit d'aplicació en el diagnòstic de la tuberculosi. S'utilitza sobretot en escorxadors, on la inspecció visual

de les canals és la manera de detectar possibles casos de tuberculosi. Als països lliures de TB, que no fan IDT, la inspecció de les canals és l'únic punt de vigilància de la malaltia.

També és una eina molt útil per als productors, els quals mitjançant la necròpsia poden conèixer quin és l'estat del seu ramat en relació amb la malaltia. La recerca i la investigació és un altre àmbit en què l'anatomia patològica està àmpliament implantada, per exemple per a avaluar l'efecte de les vacunes.⁶⁴

En el context de la vigilància passiva a escorxador, els teixits diana per detectar la malaltia són aquells que presentin lesions compatibles amb la malaltia. A partir d'aquests teixits es fa el diagnòstic definitiu, que inclou histopatologia de les lesions, tinció de ZN, PCR, cultiu microbiològic i identificació i, finalment, espilogotipatge. La detecció de les lesions compatibles amb TB, per si sola, és una tècnica d'un valor predictiu limitat segons Garcia-Saenz et al.,⁶⁵ que la xifren en un 31,4% als escorxadors de Catalunya entre 2005 i 2008, per la qual cosa són necessàries proves addicionals per confirmar la malaltia⁶⁶. En cas que ni la canal ni les despulles de l'animal presentin lesions visibles compatibles amb TB, les mostres d'elecció passen a ser els nodes limfàtics, que hauran de ser necessàriament dels següents limfocentres: cap (retrofaringi i mandibular), cavitat toràcica (mediastínic i bronquial), membre toràcic (cervical superficial o preescapular), cavitat abdominal (mesentèric i hepàtic) i glàndula mamària (supramamària).⁶⁷

Tot i que la forma anatomopatològica de la tuberculosi és molt variable i respon a l'estadi de la malaltia en el qual es troba l'animal,⁶⁸ les lesions típiques les trobem als nodes limfàtics i els pulmons i són els granulomes tuberculosos,²⁴ que a mesura que es cronifiquen poden calcificar-se⁶⁸, caseïficar-se i desenvolupar una càpsula fibrosa.²⁵ En estadis avançats, al pulmó es pot veure broncopneumònia caseosa necrotitzant com a resultat de la convergència dels diferents tubercles.¹⁹ D'altres òrgans com el fetge,⁶⁹ el ronyó, la melsa, els intestins, les mames, l'úter, els ossos i les seroses, així com els nodes limfàtics associats, també presenten lesions de la mateixa naturalesa.^{68,70,71}

Histològicament, l'aspecte de les nodulacions tuberculosos evoluciona conforme la malaltia es cronifica. Inicialment el tubercle està compost de macròfags epitelioides, cèl·lules gegants de Langhans, cèl·lules plasmàtiques, limfòcits, macròfags, neutròfils i monòcits.^{23,25,72,73} Posteriorment, el tubercle pateix necrosi caseosa central i queda estratificat en les següents capes: el nucli, format per un coàgul amb material eosinofílic homogeni i un grau variable de mineralització, el mantell, format per macròfags i cèl·lules gegants de Langhans,^{23,72,74} i la càpsula, rica en limfòcits i, en alguns casos, neutròfils, envoltada d'una capa de teixit connectiu.⁷⁴ Eventualment, tant a dins dels macròfags i les cèl·lules gegants de Langhans com extracel·lularment al nucli caseós eosinofílic^{25,74}

poden observar-se bacils, que es visualitzaran amb tincions com la tinció fluorescent de Rodamina-Auramina i la de Ziehl-Neelsen, així com amb tècniques immunològiques com la immunohistoquímica.⁷⁵

2.1.3.5. Cultiu microbiològic i PCR

El cultiu microbiològic és l'eina definitiva per al diagnòstic de tuberculosi. Les mostres dels òrgans afectats i/o dels nodes limfàtics que estableix la legislació (i que s'han vist al punt 1.1.3.4) s'han d'enviar al laboratori a 4°C en un màxim de 36 hores, tal com indica la directiva 64/432/CEE. En cas de no ser possible s'estableix la possibilitat d'enviar les mostres congelades, a -20°C. Un cop al laboratori, les mostres s'han de manipular a les instal·lacions de biocontenció de nivell 3, atesa la perillositat del possible agent que aquestes contenen.

La identificació del micobacteri es fa de dues maneres: fent una PCR directa en mostres de teixit en busca de l'agent, d'una banda, i cultivant les mostres i posteriorment fent la PCR per confirmar la presència d'aquest, de l'altra. La PCR triga tres dies a donar resultat, mentre que el cultiu és una tècnica més sensible però que requereix molt més temps; els cultius es llegeixen setmanalment i tan bon punt es detecta creixement es procedeix a identificar-ne l'etiologia mitjançant PCR, tot i que han de passar 3 mesos sense observar creixement per considerar-los negatius. S'utilitzen medis selectius com el Lowenstein-Jensen, el Coletsos i l'Stonebriks, rics en ou, tot i que també se'n poden utilitzar de rics en agar, com el Middlebrook 7H10 o el Middlebrook 7J11.^{18,76}

Amb tot, la PCR desenvolupada per a la detecció del micobacteri només detecta genoma del complex *Mycobacterium tuberculosis*, és a dir, que no distingeix entre *M.bovis*, *M.caprae* i *M.tuberculosis*.⁷⁷

2.1.4. Control de la malaltia

El control de la tuberculosi té dues vessants principals: el control de la malaltia als humans i el control de la malaltia al bestiar.

Pel que fa als humans, com s'ha vist anteriorment, fa 80 anys que existeix una vacuna com la BCG. Se segueix aplicant actualment, tot i les controvèrsies que l'envolten (quant a eficàcia i efectes secundaris), als països on la tuberculosi és endèmica i a poblacions de risc (sanitaris, nens que conviuen amb adults que la tenen, etc.) dels països desenvolupats.⁹

També hi ha tractament a la malaltia des de fa alguns anys; la isoniazida es va desenvolupar a mitjan segle XX i va suposar un canvi de paradigma quant a la tuberculosi, tot i que ja s'havien desenvolupat algunes opcions terapèutiques menys eficaces abans, com la estreptomina i el PAS o àcid para-aminosalicílic (ambós l'any 1944). La combinació d'aquest fàrmacs, amb d'altres desenvolupats

posteriorment, va permetre una millor lluita contra un bacteri que ja aleshores s'havia demostrat resistent a algun d'aquests fàrmacs.^{78,79} A partir d'aquest moment, segons Murray et al.,⁷⁸ la tuberculosi va deixar de ser prioritària per a la població i tant la recerca de nous fàrmacs com la inversió per al tractament dels malalts van disminuir dràsticament. D'aquesta manera van començar a aparèixer soques resistents: a les dècades dels 50 i 60 als Estats Units i a Anglaterra van començar a aparèixer bacteris resistents a l'estreptomicina, al PAS i a la isoniazida.⁷⁹ A la dècada dels 80, amb l'esclat de la SIDA i la popularització de la drogoaddicció apareixen els micobacteris multiresistents (o MDR), aquells que no són susceptibles a l'acció de la isoniazida ni a la de la rifampicina,⁸⁰ i ja a la dècada dels 2000 van aparèixer els micobacteris XDR o àmpliament resistents, que a més de no respondre a isoniazida ni a rifampicina, tampoc ho fan a almenys una fluoroquinolona i a un fàrmac de segona línia (aquells que s'utilitzen per tractar els pacients amb micobacteris MDR).^{80,81}

Actualment s'estima que al món hi ha 580.000 persones infectades amb un micobacteri MDR.¹¹

Quant al bestiar es distingeixen dues situacions: la dels bovins i la dels petits remugants.

Com s'ha vist anteriorment, la tuberculosi bovina és una malaltia de declaració obligatòria a l'OIE. A la Unió Europea hi ha des de fa anys un programa d'erradicació de la malaltia, que consisteix a testar els animals i sacrificar els que donin positiu. Queda totalment prohibida, tal i com estipula el Real Decreto 1047/2003, la vacunació contra la malaltia, ja que pot interferir en el diagnòstic i donar falsos positius.^{18,82}

Pel que fa als petits remugants, la tuberculosi no és una malaltia de declaració obligatòria i no hi ha a dia d'avui a Espanya programes d'erradicació, per tant, no hi ha mesures reguladores com la prohibició de la vacunació dels animals. L'estratègia d'utilitzar la vacuna BCG en el bestiar oví i caprí podria ser una bona opció per lluitar contra la malaltia.^{64,77}

2.1.5. Patogènia de la TB

2.1.5.1. Tuberculosi pulmonar

El primer estadi de la infecció tuberculosa (primoinfecció tuberculosa) s'inicia amb la inhalació dels micobacteris. Un cop arriben als alvèols, la majoria són fagocitats pels macròfags alveolars⁸³. És possible que aquests macròfags destrueixin els micobacteris i l'animal no tingui la malaltia ni sigui reactiu a les proves de diagnòstic⁵⁴, tot i que també es pot donar la situació contrària i que els micobacteris, per mitjà de diferents mecanismes com la inhibició de la formació del fagolisosoma o l'alcalinització dels enzims lisosomals⁸⁴, evadeixin l'acció bactericida dels macròfags i hi romanguin en estat latent (sense multiplicar-se) o que fins i tot s'hi multipliquin⁸⁵⁻⁸⁷.

En aquest últim cas, s'inicia l'anomenada tuberculosi pulmonar primària.⁸⁸ En aquest punt, els micobacteris segueixen replicant-se dins dels macròfags i acaben lisant-los, fet que provoca l'arribada de nous macròfags⁸⁶ i d'altres APC com les cèl·lules dendrítiques, que novament fagocitaran els micobacteris lliures.⁵⁴ Aquestes cèl·lules presentadores d'antigen drenaran els antígens tuberculosos als nodes limfàtics regionals i allà secretaran IL-12 per iniciar la resposta immunitària adaptativa,⁸⁶ si bé també podran arribar-hi bacils viables que acabin establint un nou focus infectiu que, juntament amb la lesió pulmonar, conformarà l'anomenat complex primari o de Ghon.²⁵ Mentrestant, a la zona del pulmó on inicialment han estat fagocitats els micobacteris continua desplegant-se la resposta immunitària innata, ja que continuen arribant-hi cèl·lules inflamatores de tot tipus (neutròfils, limfòcits, macròfags, cèl·lules dendrítiques) atretes per les diferents citokines i quimiocines que els macròfags i cèl·lules dendrítiques que han estat fagocitant estan secretant. És l'inici de la formació del granuloma.⁸⁹

Al cap d'un parell de setmanes, la resposta adaptativa ja està preparada.⁸⁵ Els limfòcits T CD4 del limfonode regional, en presència de concentracions importants d'IL-12 secretada per les APC,⁹⁰ s'hauran diferenciat a limfòcits Th1 i estaran preparats per iniciar la secreció de citokines proinflamatores que durà a l'activació dels macròfags.⁸⁴ Després de migrar des del limfonode fins al lloc de la lesió, els Th1, juntament amb d'altres cèl·lules com limfòcits T CD8, cèl·lules *natural killer* o els propis macròfags, iniciaran la seva acció efectora.⁵⁴

L'acció efectora dels limfòcits Th1 es basa en l'activació de la reacció d'hipersensibilitat de tipus IV (o de tipus retardat). Aquesta reacció, anomenada retardada perquè triga entre 24 i 48 hores a desenvolupar-se,⁹⁰ es basa en la secreció de diferents citokines i quimiocines (TNF- α , Interferó, diferents interleucines) amb un doble objectiu: activar els macròfags perquè comencin a destruir micobacteris⁸⁶ i promoure l'arribada via extravasació de cèl·lules inflamatores i immunitàries.⁹⁰

Formació del granuloma.

Un cop activats, els macròfags són capaços de secretar ROIs i RNIs⁹¹ i de fusionar lisosomes i fagosomes i, per tant, eliminar els bacils que tenen dins⁹², tot i que no tots són capaços de fer-ho; alguns d'ells, amb molts micobacteris fagocitats, no poden digerir-los i han de ser destruïts pels limfòcits T CD8.^{85,87} Alguns micobacteris poden romandre viables, ja sigui en el si de la lesió o dins dels macròfags, i per tant es necessitarà més reacció immunitària.⁸⁸

Així doncs, comença la formació del granuloma. Els limfòcits Th1 continuen secretant citokines amb un doble objectiu: seguir atraient cèl·lules immunitàries i convertir els macròfags presents al lloc de la lesió en cèl·lules epitelioides,⁵³ la principal cèl·lula del granuloma. La funció de les cèl·lules

epitelioides, atesa la seva composició cel·lular, s'especula que és la secreció extracel·lular de components que destrueixen els micobacteris més que no pas la fagocitosi.⁸⁸

De mica en mica el granuloma va agafant l'aspecte característic, amb un nucli format per macròfags, ja siguin modificats (epitelioides) o normals,⁹³ i eventualment per cèl·lules gegants (anomenades de Langhans quan els nuclis es disposen en forma de ferradura), resultat de la fusió de diversos macròfags epitelioides,⁹⁴ i bacils viables. Al voltant del nucli s'hi disposen els diferents tipus de limfòcits, que segueixen atraient cèl·lules del torrent sanguini,⁸³ a més de monòcits que d'allà procedeixen, fibroblasts i neutròfils.

Tuberculosi pulmonar progressiva i necrosi caseosa

L'aïllament al qual es veu sotmès el nucli del granuloma, sumat a la gran activitat metabòlica que allà es desenvolupa (macròfags activats fagocitant, cèl·lules T CD8 destruint macròfags, cèl·lules epitelioides i limfòcits secretant citoquines, etc.) i al dany tissular que s'ha produït, acaba desembocant en la formació d'una àrea central de necrosi,⁸³ formada per detritus de cèl·lules immunitàries (macròfags, neutròfils) i parenquimatoses pulmonars i també per bacils que hagin pogut sobreviure.⁹⁵ El teixit necròtic pateix una disminució de consistència i esdevé caseós (del llatí *caseum*, formatge)⁹⁶ i en aquest medi, anòxic i ple de restes cel·lulars, la majoria de bacils acaben morint.⁹⁴

Tal i com recull Jacques Grosset⁹⁷ a partir d'aquest moment poden passar tres coses:

-Organització de la necrosi caseosa: els macròfags envolten la lesió i destrueixen els bacils i els fibroblasts encapsulen el granuloma. En aquest escenari, que és l'ideal, no queden bacils viables i la lesió s'acaba calcificant.

-No organització de la necrosi caseosa: les lesions no s'encapsulen i romanen tal i com estaven temporalment. Posteriorment evolucionen cap a l'organització o cap a la líquefacció

-Estovament de la necrosi caseosa o líquefacció: el càseum s'estova i s'escampa per l'arbre bronquial (en cas que algun dels granulomes estigui al bronqui). És el pitjor escenari, ja que provoca cavitació pulmonar, creixement extracel·lular dels bacils, a causa de l'oxigenació de l'ambient, i nous focus d'infecció en el mateix individu. A més, els animals cavitats, quan tossen, alliberen bacils que poden transmetre la infecció a altres individus o animals.

2.1.5.2 Latència, reactivació i tuberculosi secundària

La tuberculosi secundària és la reaparició de la malaltia tuberculosa i la simptomatologia associada a aquesta, ja sigui perquè un individu que ha patit la malaltia anteriorment es torna a infectar (reinfecció) o perquè havia mantingut bacils en estat latent que en un moment donat es tornen a activar (reactivació). Clínicament es caracteritza per ser més agressiva que la tuberculosi primària.⁸⁸

La latència i la reactivació són fenòmens descrits en la tuberculosi humana però poc clars en el bestiar domèstic.²⁵ La latència s'acostuma a establir perquè els bacils queden en estat no replicatiu, tot i que també hi ha la possibilitat que sí que es repliquin de forma normal però el sistema immunitari de l'hoste aconseguixi fer de contrapès i eliminar part dels que resulten de les replicacions, o fins i tot que tinguin uns cicles de replicació erràtics (per canvis metabòlics del propi bacil) que per sí mateixos evitin la seva expansió.⁹⁸ De qualsevol de les tres maneres, la infecció no progressarà i l'individu, tot i ser reactiu a les proves, no mostrarà simptomatologia.⁵⁴ Quant a la reactivació, sempre és provocada per deficiències o irregularitats del sistema immunitari, ja sigui per presència de malalties concomitants o immunosupressores (com la SIDA) o per causes intrínseques de l'individu.⁹⁹

2.1.5.3. Manifestacions extrapulmonars

Tal i com hem dit, és freqüent l'afectació dels nodes limfàtics regionals, que acaben desenvolupant granulomes de similar composició als pulmonars.²⁵ També poden desenvolupar tubercles altres nodes limfàtics, distants a la lesió, als quals hagin pogut arribar bacils viables per via sanguínia o limfàtica.

Per aquestes mateixes vies és també possible que es generalitzi la malaltia i produeixi la variant més greu de la malaltia, l'anomenada tuberculosi miliar o disseminada, en la qual els bacils s'escampen, ja sigui al principi de la infecció (generalització primerenca) o un temps després de produir-se (generalització tardana),²⁵ per tot el cos i produeixen lesions tipus tubercle a qualsevol òrgan al qual hagin tingut accés.⁹²

Per concloure, tal com s'ha dit anteriorment, també és possible la infecció via digestiva, la qual durà a l'anomenada tuberculosi intestinal, amb inflamació de l'intestí i aparició de lesions granulomatoses als nodes limfàtics mesentèrics.

3. Model experimental de TB en ovella

A les instal·lacions de bioseguretat de nivell 3 del CReSA es va desenvolupar el model experimental de TB en ovella que es detalla a continuació, i del qual beu l'estudi de la càpsula del granuloma que s'ha dut a terme.

Es van seleccionar 12 xais de raça Lacaune de 2 mesos de vida, negatius a la prova de l'interferó gamma, i la meitat van ser vacunats amb una soca viva de la BCG. Els altres 6 animals van quedar com a controls. Al cap de 6 setmanes després es van traslladar a les instal·lacions de bioseguretat 3 del CReSA i es van infectar amb un inòcul de *M. caprae*, tal com detallen Balseiro et al..⁶⁴ Els animals van ser eutanasiats i necropsiats a 12 setmanes post infecció (setmana 19 de l'experiment).

Els pulmons es van extreure sencers i es van fixar en formalina tamponada al 10%. Un mes més tard, un cop fixats completament, els pulmons van ser analitzats per TC (**Fig.4**). Es va calcular el volum pulmonar, el volum de les lesions tuberculosos i el volum de les lesions calcificades.

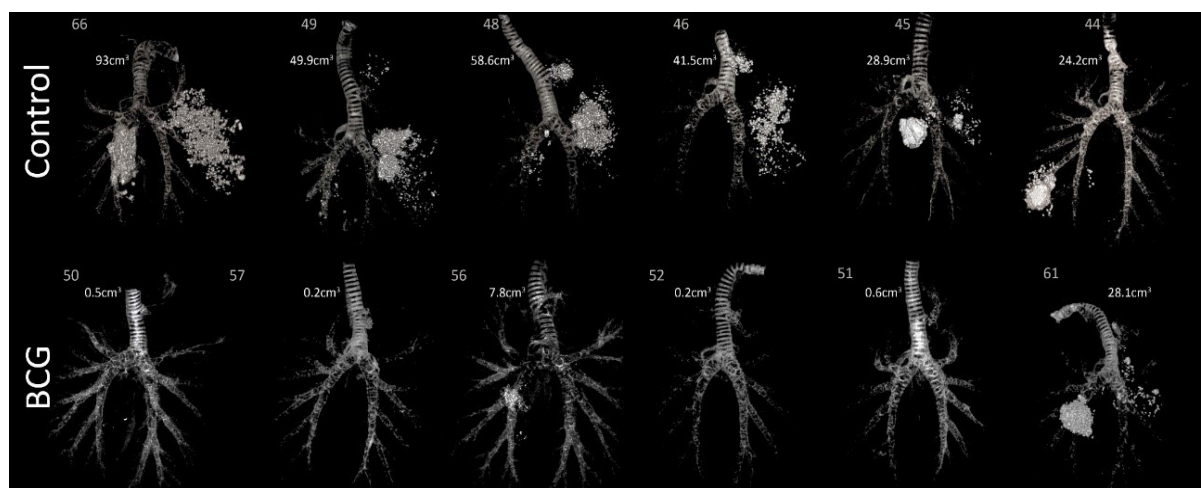


Figura 4. Tomografies computeritzades dels pulmons fixats en formalina dels 12 xais que van formar part de l'experiment. S'especifica el volum total de les lesions de cada pulmó (en cm³). La tràquea i l'arbre bronquial es mostren per a tenir referència anatòmica

Es va demostrar que la BCG és una vacuna protectora enfront tuberculosi en el model experimental d'ovella dut a terme al CReSA, per molts motius, ja que els animals vacunats van mostrar, respecte dels controls:

- menys pirèxia
- menys pèrdua de condició corporal
- menys volum de lesió pulmonar (Fig. 4)

-major resposta immunitària enfront la infecció (majors nivells d'IgG específic i d'IFN- γ)

A més, l'estudi incloïa l'aplicació d'una vacuna inactivada per calor administrada per via oral que es va demostrar ineficaç, almenys per aquesta via d'administració.⁶⁴

Aquestes troballes van motivar que en el present estudi s'avalués l'efecte de la BCG sobre la fibrosi dels granulomes i que l'estudi dels granulomes d'animals que havien rebut la vacuna inactivada per calor via oral s'acabés descartant, atès que s'havia demostrat ineficaç.

4. Estudi experimental

4.1 Hipòtesi

La hipòtesi de l'estudi és que els granulomes petits dels animals vacunats tenen certes característiques referents al teixit conjuntiu que els diferencien dels granulomes petits dels animals control i que expliquen per què els primers no evolucionen, creixen i conflueixen amb d'altres i els segons sí que ho fan, tal com s'ha comprovat en l'estudi de Balseiro et al.⁶⁴

4.2 Objectiu

L'objectiu de l'estudi és evidenciar diferències, pel que fa a la càpsula fibrosa, entre els granulomes petits d'animals vacunat amb BCG i d'animals control, mitjançant la tinció tricròmica de Masson, que permetin explicar l'evolució diferent de la lesió tuberculosa en cada grup.

4.3 Materials i mètodes

Un cop feta la TC es van filetejar els pulmons en llesques de 0,5cm i es van confeccionar cassets histològics amb totes les lesions (en animals amb lesions miliars es van seleccionar 3-4 cassets que fossin representatius de les àrees afectades).

Les lesions pulmonars seleccionades es van processar amb el processador automàtic de teixits LEICA TP1020. Es van deshidratar al seu pas per les estacions 3 a 7, que contenen concentracions creixents d'alcohol i a les estacions 8, 9 i 10 es van submergir en xilol per a eliminar-los l'alcohol. Finalment, a les dues últimes estacions (11 i 12), es van infiltrar amb parafina líquida (a 58°C). Un cop infiltrats, els teixits es van submergir en parafina líquida i refredar al formador de blocs LEICA EG1150. Dels blocs resultants es van fer talls de 3 μ m de gruix amb el micròtom LEICA RM2245, que es van posar damunt de portaobjectes després de passar pel bany histològic (45°C).

Tinció hematoxilina eosina i tinció de Masson

De cada bloc es van fer dos talls, els quals es van desparafinar amb el tenyidor automàtic de teixits LEICA AUTOSTAINER XL. El programa de desparafinació consisteix en fer el protocol d'inclusió en parafina però en sentit contrari; les mostres se submergeixen primer en xilol per a desparafinar, després en concentracions decreixents d'etanol (100º, 96º, 80º i 50º) i finalment en aigua destil·lada.

Posteriorment es van tenyir amb hematoxilina i eosina (H/E) un dels talls i amb la tinció de Masson l'altre.

La tinció hematoxilina-eosina utilitza en primera instància la hematoxilina, un colorant blau, per a tenyir els nuclis cel·lulars, i posteriorment la eosina, de color vermell, que serveix com a contrast citoplasmàtic i del teixit extracel·lular. Es va realitzar amb el tenyidor automàtic de teixits LEICA AUTOSTAINER XL. Els resultats d'aquesta tinció no es presenten en aquest estudi.

Pel que fa a la tinció de Masson, és una tècnica que es fa servir per a evidenciar les fibres musculars i de col·lagen. Utilitza quatre colorants: la hematoxilina, per tenyir els nuclis de color blau, la solució d'Escarlata de Biebrich-fucsina àcida, per tenyir els citoplasmes de color vermell, i l'anilina, que és el tint blau que impregna el col·lagen. Aquesta tinció es va realitzar de manera manual.

Ambdós grups de preparacions es van passar en última instància pel programa del tenyidor automàtic de teixits LEICA AUTOSTAINER XL. Un cop deshidratats es van acabar de muntar les preparacions amb el cobreobjectes LEICA CV5030.

Selecció de les lesions a avaluar.

Per a poder fer comparacions entre els dos grups d'animals, de cadascun dels 12 xais es van seleccionar aleatòriament 15 granulomes d'un diàmetre inferior a 1 mm i 10 d'entre 1 i 5 mm. Finalment es van utilitzar per a l'estudi 180 granulomes de menys d'1 mm de diàmetre (90 d'animals BCG i 90 d'animals control) i 111 d'entre 1 i 5 mm (51 i 60 respectivament). Inicialment també s'havia pensat seleccionar 10 granulomes d'entre 5 mm i 2 cm, tot i que es va acabar descartant la possibilitat ja que hi havia molt pocs granulomes que la fessin (fins i tot hi havia animals BCG que no en tenien cap) i no s'haurien pogut comparar els resultats entre grups atesa la diferència en el nombre de granulomes dels dos grups

Per a la selecció i posterior avaluació dels granulomes es van utilitzar les preparacions tenyides amb la tinció de Masson, que es van visualitzar amb el microscopi Nikon ECLIPSE 50i. Les fotos van ser preses amb la càmera Nikon DIGITAL CAMERA DXM1200F.

Paràmetres avaluats.

De cadascun dels granulomes seleccionats es van avaluar quatre paràmetres: la presència de càpsula, el seu gruix, la quantitat d'estroma i la localització en el pulmó.

Presència de càpsula

La integritat de la càpsula es va avaluar de forma qualitativa, dividint-se els granulomes en tres grups: sense càpsula o amb càpsula absent (A), amb càpsula parcial (P) i amb càpsula completa (C) (**Fig.5**). El criteri de classificació dels granulomes va ser l'observació d'una o més capes concèntriques de fibres de col·lagen (de color blau per la tinció de Masson) adherides a la zona més perifèrica del granuloma. Així, els granulomes que no tenien capes de fibres de col·lagen a cap zona del perímetre van ser considerats amb càpsula absent i els que el tenien tot envoltat de fibres de col·lagen van anar al grup de càpsula completa; aquells que tenien zones del perímetre amb fibres de col·lagen al voltant i d'altres sense es van considerar granulomes amb càpsula parcial. La presència de fibres concèntriques de col·lagen en zones del granuloma que no fossin estrictament a la perifèria del mateix no es van considerar càpsula.

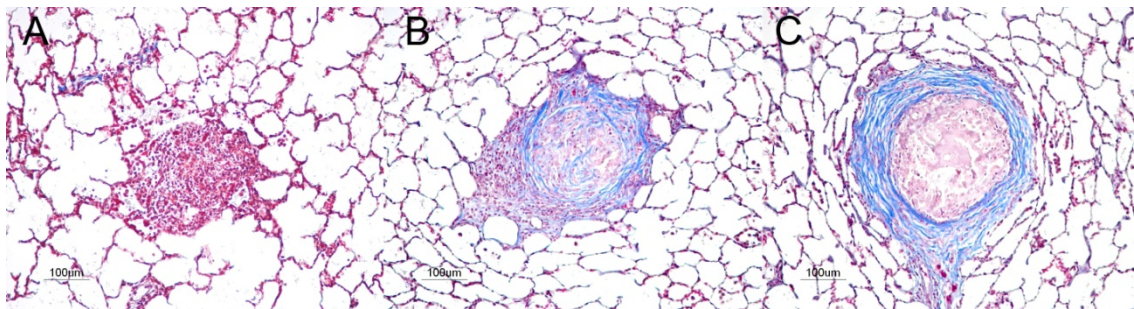


Figura 5. (a) Granuloma sense càpsula. (b) Granuloma amb càpsula parcial. (c) Granuloma amb càpsula completa

Gruix de la càpsula

El gruix de la càpsula es va avaluar de forma semiquantitativa comptant quantes capes de fibres de col·lagen envoltaven el granuloma (**Fig.6**). Els granulomes es van dividir en 5 grups: gruix 0 (0 capes de fibres de col·lagen), gruix 1 (de 1 a 2 capes), gruix 2 (de 3 a 4 capes), gruix 3 (de 5 a 6 capes) i gruix 4 (7 capes o més). El gruix de càpsula d'aquells granulomes que no tenien el mateix nombre de capes en tot el perímetre i també d'aquells amb càpsula parcial es va calcular fent una valoració global de les diferents zones.

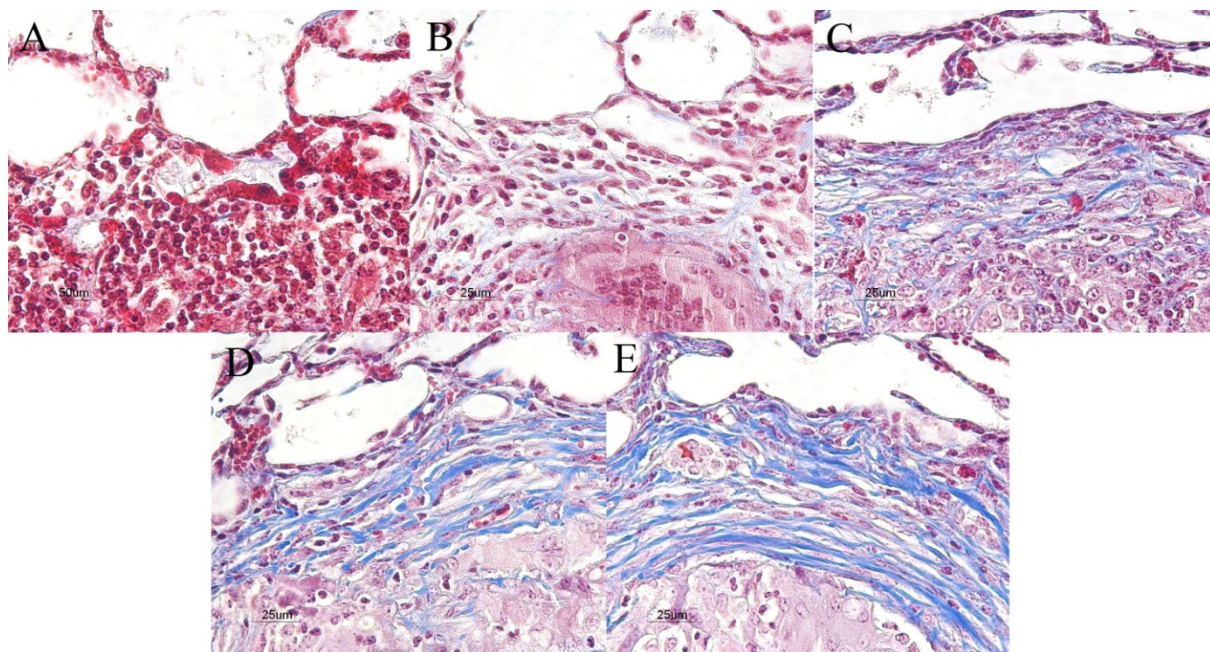


Figura 6. (a) Granuloma sense càpsula (0). (b) Granuloma amb càpsula de gruix 1. (c) Granuloma amb càpsula de gruix 2. (d) Granuloma amb càpsula de gruix 3. (e) Granuloma amb càpsula de gruix 4

Quantitat d'estroma

La quantitat d'estroma (teixit conjuntiu que dona suport a les cèl·lules del parènquima) també es va avaluar de forma semiquantitativa, en base en l'observació de fibres de col·lagen (de color blau) a l'interior dels granulomes (**Fig.7**). Es van fer 4 categories de quantitat d'estroma: 0, quan no se n'observava o la seva presència era mínima, 1, quan n'hi havia poc, 2, quan n'hi havia bastant i 3 quan n'hi havia molt.

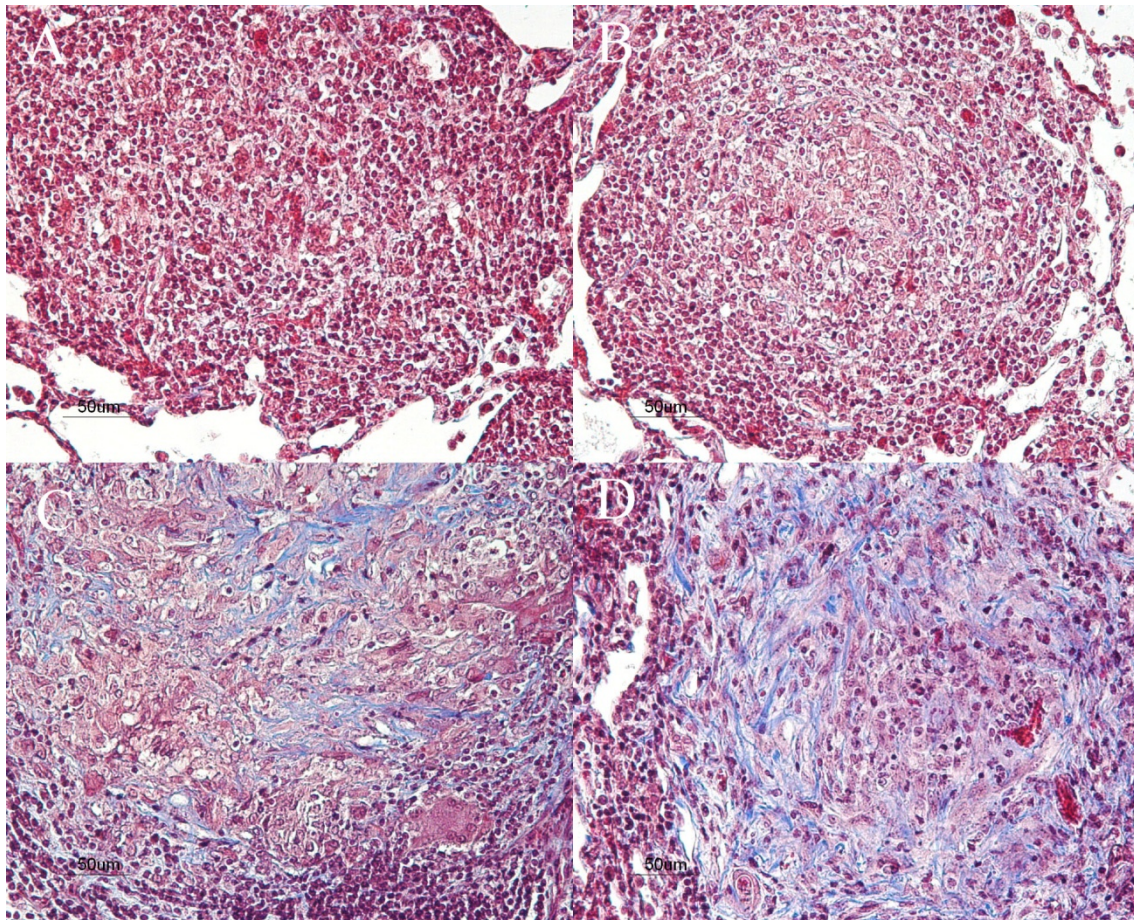


Figura 7 (a) Granuloma sense estroma (0). (b) Granuloma amb nivell 1 d'estroma. (c) Granuloma amb nivell 2 d'estroma. (d) Granuloma amb nivell 3 d'estroma

Localització del granuloma

Es va avaluar de forma qualitativa la localització dels granulomes, dividint-los en 6 grups: localització vascular, localització bronquial, localització septal, localització pleural, localització parenquimatosa per a aquells que no contactaven ni amb vasos sanguinis, ni amb bronquis, ni amb septe, ni amb la pleura i un sisè grup per a aquells granulomes que estaven en contacte amb dues o més estructures de les anteriorment citades (**Fig 8**).

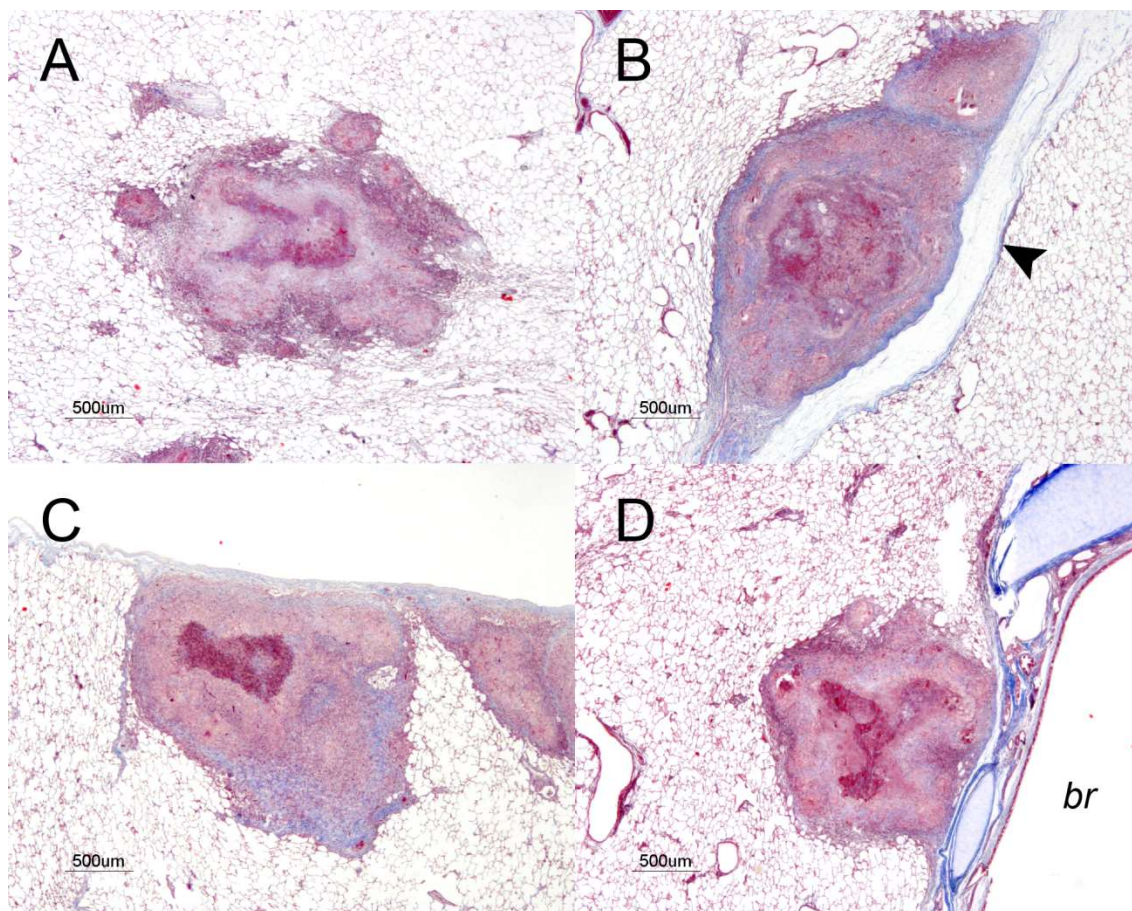


Figura 8. (a) Granuloma de localització exclusivament parenquimatosa. (b) Granuloma de localització septal. (c) Granuloma de localització pleural. (d) Granuloma de localització bronquial. S'assenyala amb un cap de fletxa la localització del septa i amb *br* la llum del bronqui

Anàlisi de dades

Totes les dades obtingudes de l'observació i avaluació dels granulomes es van entrar a un full de càlcul Excel (Microsoft Office Excel 2007), a partir del qual es van processar. Es van avaluar diferències entre grups i també a nivell individual, tant entre animals del mateix grup com de grups diferents, i es va confirmar mitjançant estadística si aquestes eren significatives o no.

La prova estadística que es va realitzar va ser la prova Z, que analitza les diferències entre proporcions. La fórmula de la prova és la següent:

$$Z = \frac{Px - Py}{\sqrt{P(1 - P)\left(\frac{1}{N_x} + \frac{1}{N_y}\right)}}$$

on:

P_x és el nombre de granulomes o animals del grup X positius al paràmetre estudiat, entre el *nombre* total de granulomes o animals del grup X. Per tal que sempre doni positiu, P_x sempre serà el valor més gran.

P_y és el nombre de granulomes o animals del grup Y positius al paràmetre estudiat, entre el nombre total de granulomes o animals del grup Y. Per tal que sempre doni positiu, P_y sempre serà el valor més petit.

P és la suma total de granulomes d'animals positius al paràmetre estudiat (d'ambdós grups) entre el nombre total de granulomes o animals (d'ambdós grups).

N_x és el mida de la mostra del grup X

N_y és el mida de la mostra del grup Y

Quan $Z < 1,96$ s'assumeix amb un 95% de confiança que les diferències observades no són significatives, mentre que quan $Z > 1,96$, s'assumeix amb un 95% de confiança que sí que ho són.

4.4 Resultats

Descripció de la tinció

La tinció de Masson va evidenciar les estructures fibroses dels granulomes tuberculosos al parènquima pulmonar. El nucli dels granulomes es va teñir de color vermellós, tot i que en alguns també va revelar la presència de filaments de color blau, de naturalesa fibrosa, anomenats estroma. La tinció també va teñir de color blau la càpsula dels granulomes. Es va observar una gran variabilitat entre animals: alguns tenien els granulomes completament encapsulats, amb inclús 9 i 10 capes de fibres concèntriques envoltant-los, mentre que d'altres no tenien cap capa i estaven completament desproveïts de càpsula; d'altres mostraven diferents gruixos de càpsula en diferents zones del perímetre del granuloma, i fins i tot se'n van veure que estaven parcialment encapsulats, amb algunes zones de la perifèria desproveïdes. Les estructures riques en fibròcits, com els septes i la pleura, així com els cartílags dels bronquis i certes àrees adjacents a bronquis i vasos sanguinis, es van teñir de color blau. Els endotelis dels vasos sanguinis i els epitelis dels bronquis i bronquíols van agafar tonalitats vermelloses.

Es van observar diferències notables entre animals pel que fa a la intensitat de la tinció. En alguns animals els granulomes es van teñir amb una intensitat de color molt alta, tant els citoplasmes tenyits de color vermell com les fibres de col·lagen impregnades de blau, mentre que d'altres van captar molt poca quantitat de colorant i la imatge va quedar molt tènue i de difícil visualització i interpretació al microscopi òptic.

Presència de càpsula

Analitzant tots els granulomes conjuntament, la proporció de granulomes sense càpsula va ser més gran en animals CTRL que en BCG, tant en el grup de granulomes de menys d'1 mm (49% vs 40%), on no hi va haver diferències significatives, com en el grup de granulomes d'entre 1 i 5 mm (40% vs. 18%), on si que les hi va haver ($Z=2,61$). A la vegada, els animals vacunats van tenir més granulomes amb càpsula parcial, tant en granulomes petits (44% vs 28%) com en grans (71% vs. 52%). Aquestes diferències van ser estadísticament significatives ($Z=2,27$ i $Z=2,03$ respectivament). (Fig.9).

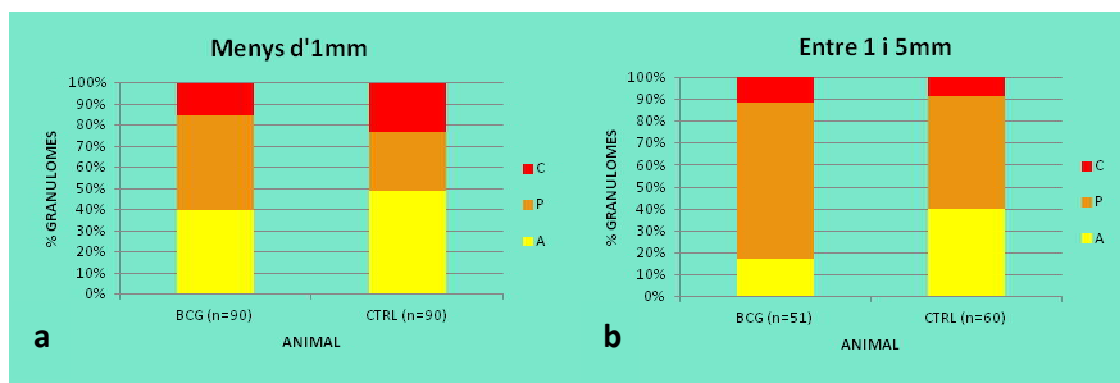


Figura 9. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C); BCG, grup vacunat, CTRL, grup no vacunat. (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C)

D'altra banda, es va observar una variabilitat molt evident entre individus: en els dos grups (CTRL i BCG) hi havia animals molt encapsuladors (50, 61 i 66) mentre que d'altres encapsulaven molt poc (44, 49 i 51) (Fig.12). De totes maneres, si analitzàvem aquesta variabilitat individual en funció del grup (CTRL vs BCG) i de la mida dels granulomes, es van poder evidenciar algunes diferències entre grups. En el cas dels més petits (<1 mm) no es van observar diferències entre grups, ja que tots dos van tenir animals molt encapsuladors, d'altres poc encapsuladors, i alguns que ho eren mitjanament (Fig.10).

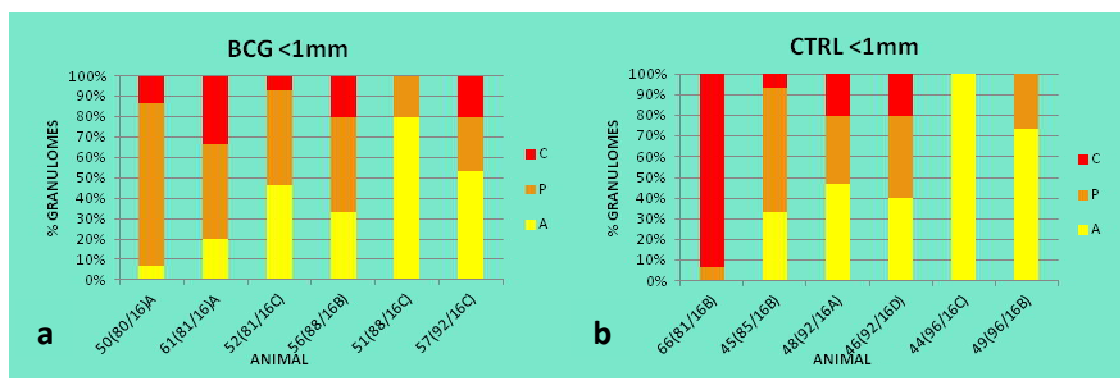


Figura 10. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre d'animals BCG amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C) dels animals BCG. (b) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre d'animals CTRL amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C)

En canvi, pel que fa als granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre, sí que es van veure diferències entre grups, ja que la majoria dels animals vacunats amb BCG (5/6) encapsulaven la pràctica totalitat de granulomes, mentre que al grup de controls aquesta proporció era més baixa (3/6). Aquesta diferència no va resultar significativa (**Fig.11**).

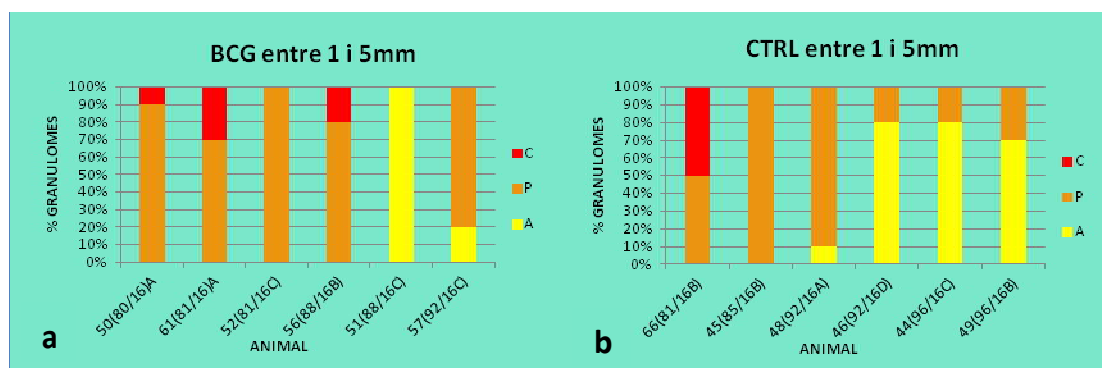


Figura 11. (a) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals BCG amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C). (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals CTRL amb càpsula absent (A), parcial (P) o completa (C)

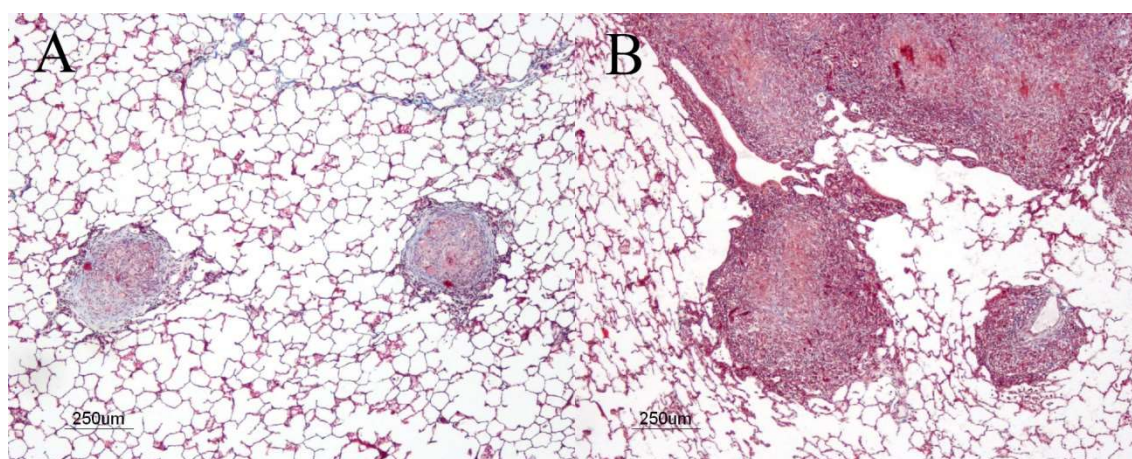


Figura 12: (A) Granulomes encapsulats de l'animal BCG 50. (B) Granulomes no encapsulats de l'animal control 44. S'observa que els granulomes de l'animal control (B) són més grans i conflueixen

Gruix de la càpsula

Com a l'apartat "Presència de càpsula", es van veure poques diferències entre els grups d'animals en els granulomes de <1 mm de diàmetre. Els percentatges de granulomes <1 mm amb gruix de càpsula 0 i 1 dels grups BCG i CTRL van ser, respectivament, 40 i 36%, i 49 i 27%. Els percentatges de granulomes <1 mm amb un gruix de càpsula 2, 3 i 4 van ser pràcticament idèntics als dos grups d'animals. En els granulomes d'entre 1 i 5 mm és on es van tornar a fer les diferències entre grups, amb els animals control amb una major proporció de granulomes no encapsulats (40%) que els BCG

(18%), com ja s'ha dit anteriorment. També es van observar diferències significatives en el percentatge de granulomes amb càpsula de gruix 1 ($Z=2,14$), que els animals vacunats tenien en més proporció (33% vs. 18%). La resta de gruixos de càpsula també els van tenir en major proporció els animals vacunats, tot i que no es van observar diferències significatives (**Fig.13**).

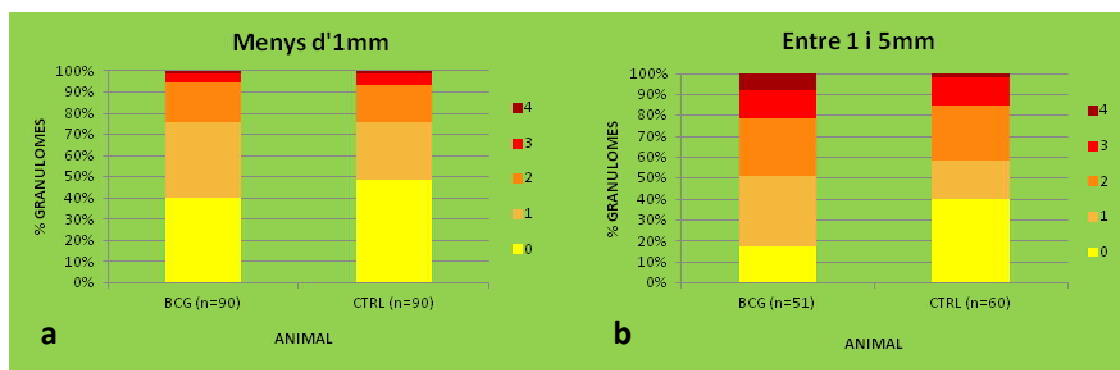


Figura 13. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4); BCG, grup vacunat, CTRL, grup no vacunat. (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4)

Quant als individus, es va observar que dos, un BCG (animal 61) i un Ctrl (animal 66) (**Fig.16**), van ser molt més encapsuladors que els altres, sobretot en els granulomes de mida més gran (**Fig.14** i **Fig.15**).

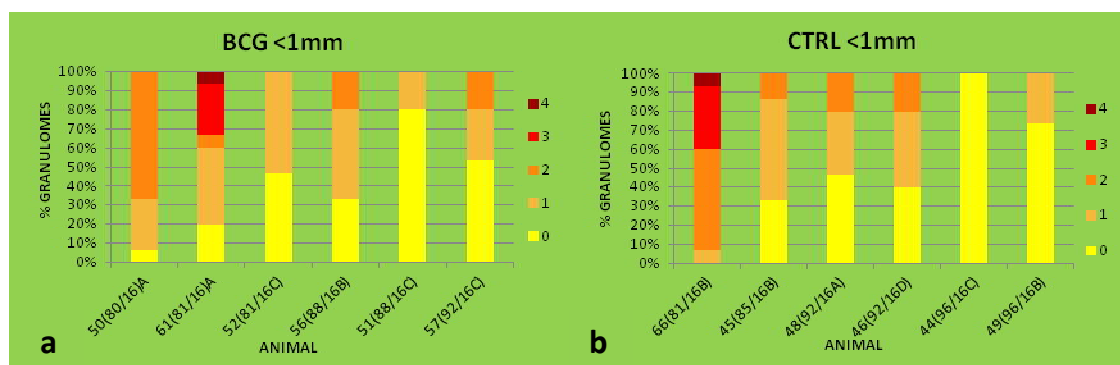


Figura 14. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre d'animals BCG amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4). (b) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre d'animals CTRL amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4)

A més, en els granulomes d'entre 1 i 5 mm, es va observar que hi havia 4 animals BCG que estaven encapsulant amb gruixos importants (gruixos 3 i 4), mentre que en el grup CTRL només hi havia 2 animals que tinguessin gruixos de les categories 3 i 4. Aquesta diferència no va ser significativa. (**Fig. 15**).

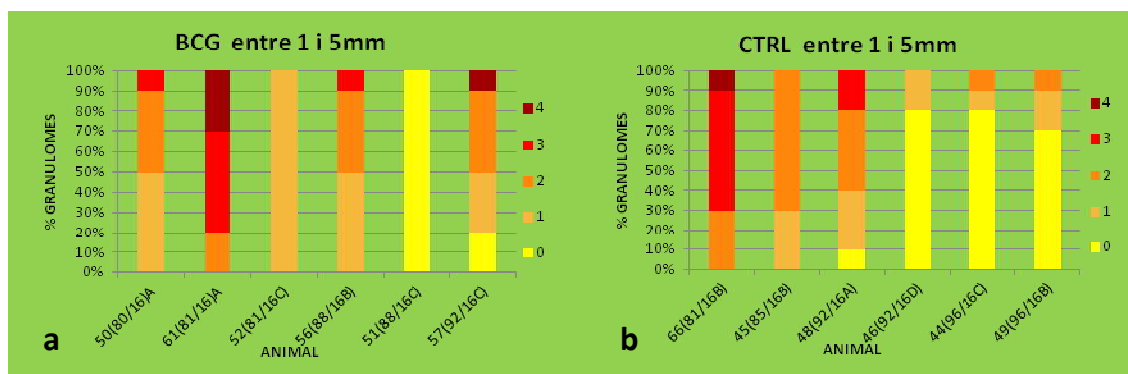


Figura 15. (a) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals BCG amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4). (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals CTRL amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4)

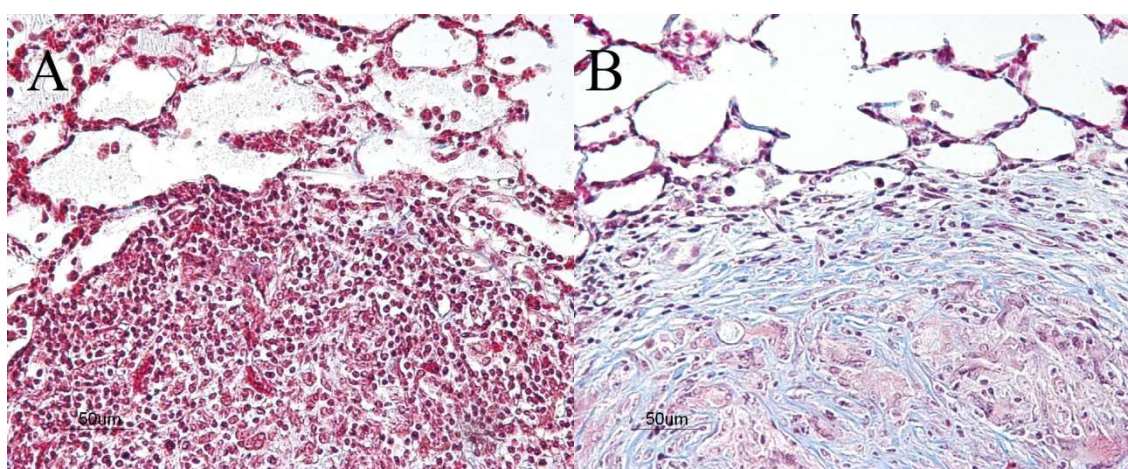


Figura 16. (a) Granuloma sense càpsula de l'animal control 44. (b) Granuloma amb càpsula gruixuda de l'animal BCG 50

Quantitat d'estroma

Analitzant tots els granulomes junts, els animals vacunats van tenir un percentatge significativament menor ($Z=3,67$) de granulomes <1 mm sense estroma (12%) que els animals control (36%) i un percentatge significativament major ($Z=3,07$) de granulomes <1 mm amb un nivell 2 d'estroma (41% vs. 20%). En els granulomes d'entre 1 i 5 mm els percentatges dels dos grups es van igualar, alhora que van desaparèixer els granulomes sense estroma (4% als BCG i 0% als CTRL) (**Fig.17** i **Fig.20**).

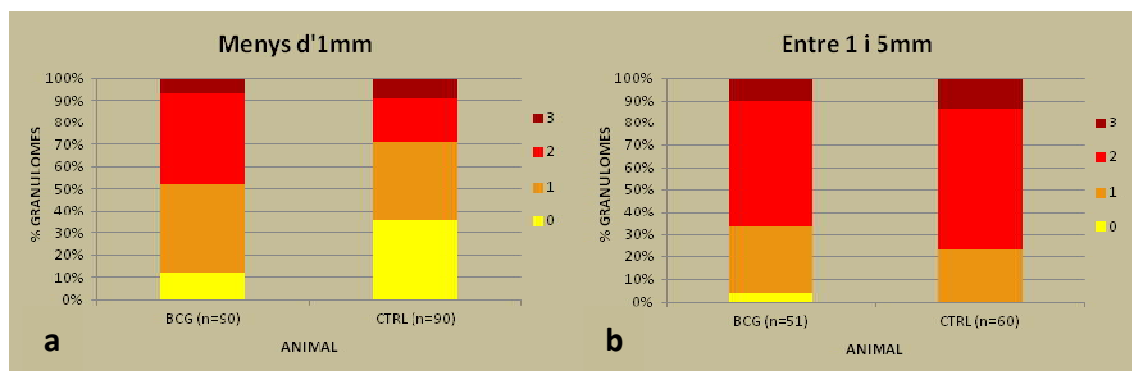


Figura 17. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3); BCG, grup vacunat, CTRL, grup no vacunat. (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3)

En analitzar els animals individualment es van veure algunes diferències entre grups. Hi va haver dos animals control que van tenir més del 50% de granulomes de menys d'un mil·límetre sense estroma i dos més que van tenir més del 30% (4/6 animals amb més del 30% de granulomes sense estroma), mentre que al grup d'animals BCG no n'hi va haver cap que superés aquest percentatge (**Fig.18**). Aquesta diferència de 2 contra 0 animals amb més del 50% dels granulomes de menys d'un mil·límetre sense estroma no va ser estadísticament significativa.

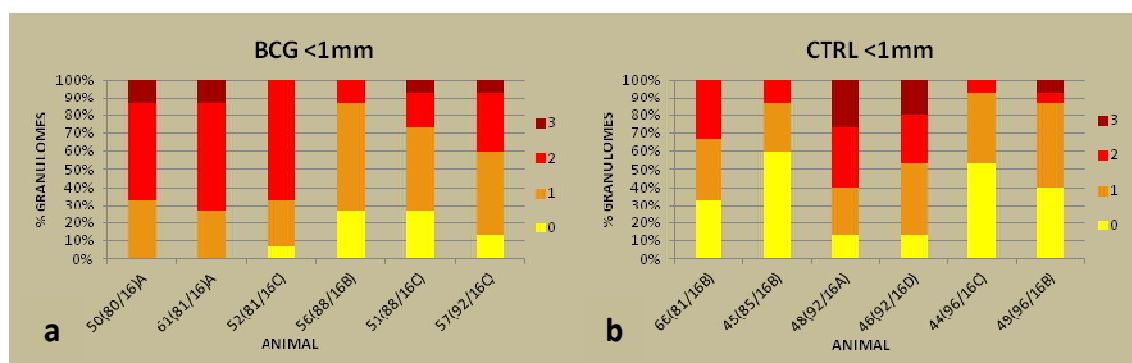


Figura 18. (a) Percentatge de granulomes de <1 mm de diàmetre d'animals BCG amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3). (b) Percentatge de granulomes de <1 mm d'animals CTRL amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3)

La gran majoria de granulomes de mida més gran va tenir una mínima quantitat d'estroma, a excepció dels d'un animal BCG, el 51, que va tenir prop d'un 30% de granulomes sense estroma. A excepció d'aquesta, no hi va haver diferències aparents entre grups (**Fig.19**).

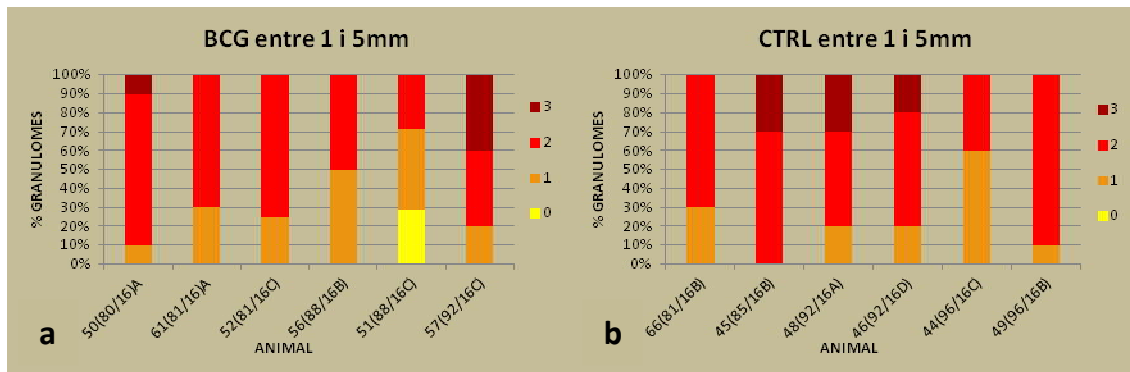


Figura 19. (a) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals BCG amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3). (b) Percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals CTRL amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3)

Si comparem els granulomes per la seva mida, independentment del grup BCG o CTRL, el percentatge de granulomes (BCG i CTRL) d'entre 1 i 5 mm amb una quantitat notable d'estroma (estroma 2+ estroma 3) va ser significativament superior al dels granulomes (BCG i CTRL) de menys d'1 mm (72% vs. 38%; $Z=5,59$), així com va ser significativament inferior (28% vs. 62%; $Z=5,59$) el de granulomes d'entre 1 i 5 mm amb poc estroma (estroma 0 + estroma 1).

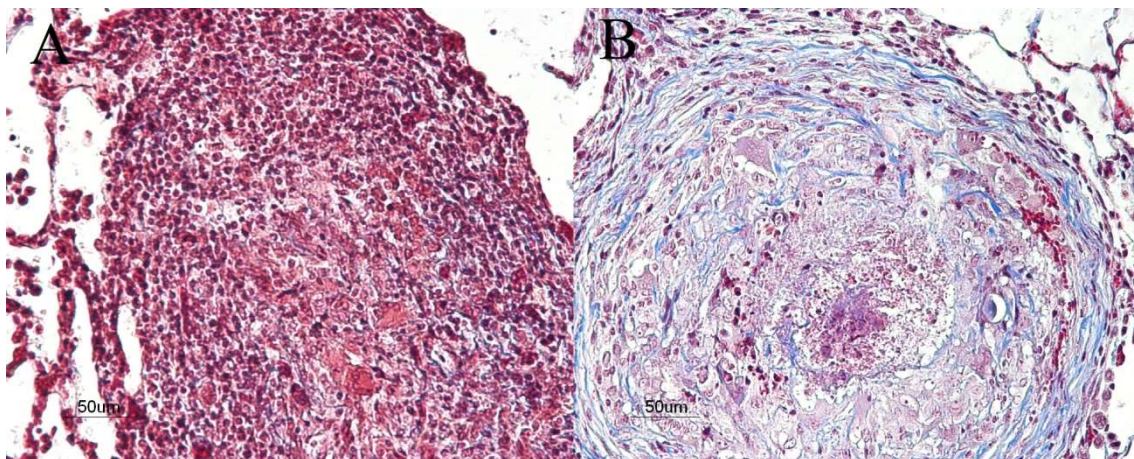


Figura 20. (a) Granuloma sense estroma de l'animal control 44. (b) Granuloma amb molt estroma de l'animal BCG 50

Localització dels granulomes

Quant a la presència de càpsula, es va observar que un 45% dels granulomes de localització parenquimatosa no tenien càpsula, per un 33% dels granulomes amb altres localitzacions. Aquesta diferència va ser significativa ($Z=1,96$). Per contra, un 49% dels granulomes amb localització no parenquimatosa van tenir càpsula parcial i un 17% càpsula completa, per un 40% i 14% respectivament dels granulomes de localització parenquimatosa (**Fig.21**). Aquestes diferències no van ser significatives.

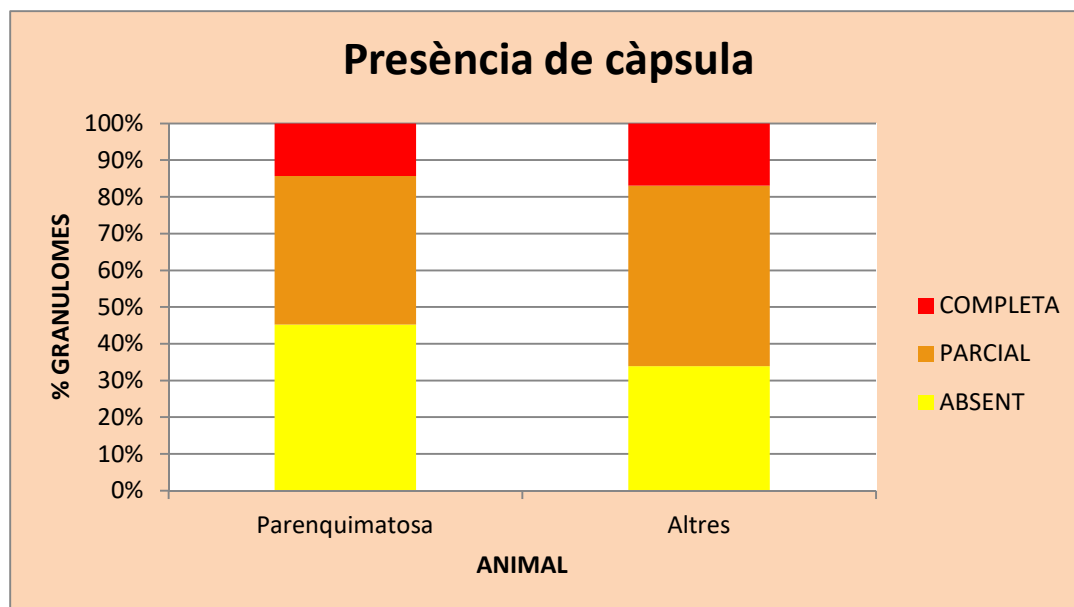


Figura 21. Percentatge de granulomes amb càpsula absent, parcial o completa en funció de la seva localització

Es va veure que tant els granulomes BCG com els CTRL tenien un percentatge superior de granulomes de localització parenquimatosa sense càpsula al dels granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa i un percentatge inferior de granulomes de localització parenquimatosa amb càpsula parcial. Aquestes diferències no van ser estadísticament significatives. Entre grups d'animals es van veure les següents diferències: en els granulomes de localització parenquimatosa, major proporció de granulomes sense càpsula en els animals CTRL i major proporció de granulomes amb càpsula parcial en els animals BCG. Aquestes diferències no van ser significatives. En els granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa es van observar les dues mateixes situacions, essent la última, és a dir, la diferència entre percentatges de granulomes de localització *altres* amb càpsula parcial, significativa ($Z=2,57$) (**Fig.22**).

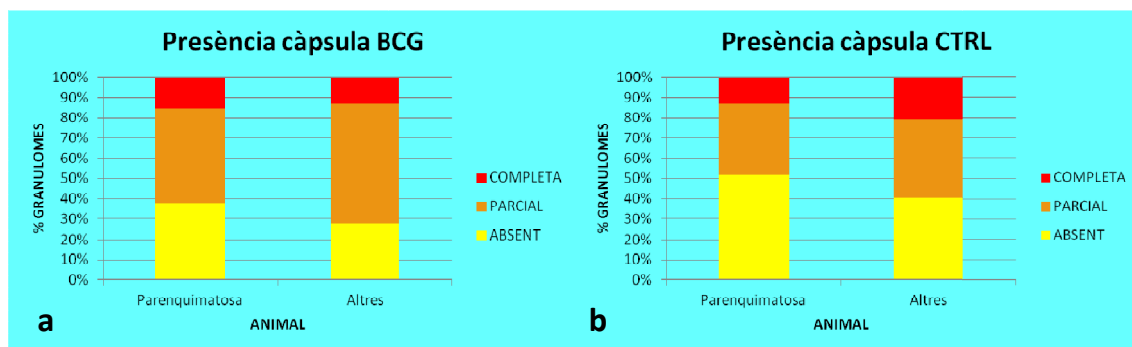


Figura 22. (a) Percentatge de granulomes d'animals BCG amb càpsula absent, parcial o completa, en funció de la seva localització. (b) Percentatge de granulomes d'animals CTRL amb càpsula absent, parcial o completa, en funció de la seva localització

Pel que fa al gruix de la càpsula, es va veure que els granulomes parenquimatosos tenien significativament ($Z=2,16$) més càpsules de gruix 0 i 1 (74%) que els que no ho eren (62%), mentre que el percentatge de granulomes amb gruixos 3 i 4 va ser superior en els granulomes de localització no parenquimatosa (15%) que en els de localització parenquimatosa (5%) (Fig.23).

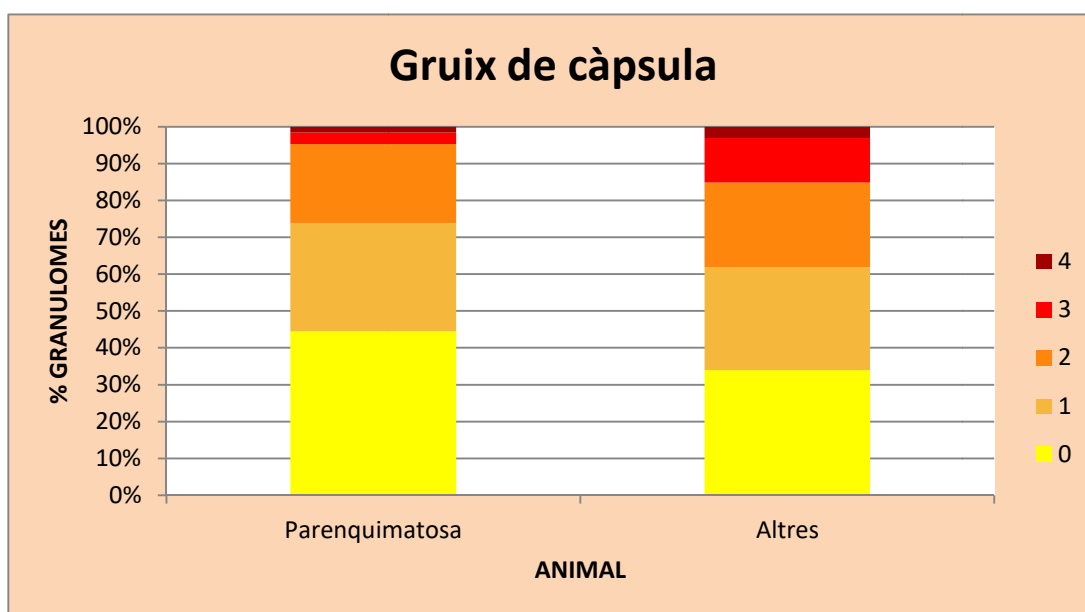


Figura 23. Percentatge de granulomes amb càpsula de gruix zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4) en funció de la seva localització

Al grup de BCG es va veure que els granulomes amb gruix 3 de càpsula de localització no exclusivament parenquimatosa eren significativament superiors als de localització parenquimatosa ($Z=2,25$). Aquesta diferència també es va observar als granulomes CTRL, tot i que no va ser estadísticament significativa. Entre percentatges granulomes de gruixos 1, 2 i 4 no es van observar diferències significatives, mentre que les dels granulomes de gruix 0 estan comentades a l'apartat *Presència de càpsula*. Entre grups es van trobar diferències notables en el percentatge de granulomes

de localització parenquimatosa amb gruix de càpsula 1, tot i que no van ser significatives. Aquesta mateixa diferència es va trobar en els granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa, on sí que va ser estadísticament significativa ($Z=2,04$) (Fig.24).

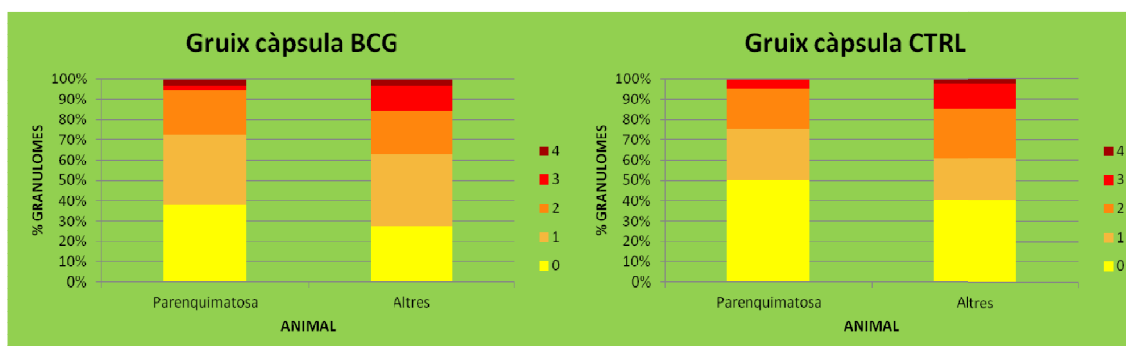


Figura 24. (a) Percentatge de granulomes d'animals BCG amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4) en funció de la seva localització. (b) Percentatge de granulomes d'animals CTRL amb gruix de càpsula zero (0), u (1), dos (2), tres (3) i quatre (4) en funció de la seva localització

Finalment, pel que fa a la quantitat d'estroma, es va veure que els de localització parenquimatosa tenien més proporció de granulomes sense estroma o amb estroma 1 (52% vs. 45% dels no parenquimatosos) i menys granulomes amb estroma 2 i 3 (48% vs. 55 dels no parenquimatosos), tot i que aquestes diferències no van ser significatives (Fig.25).

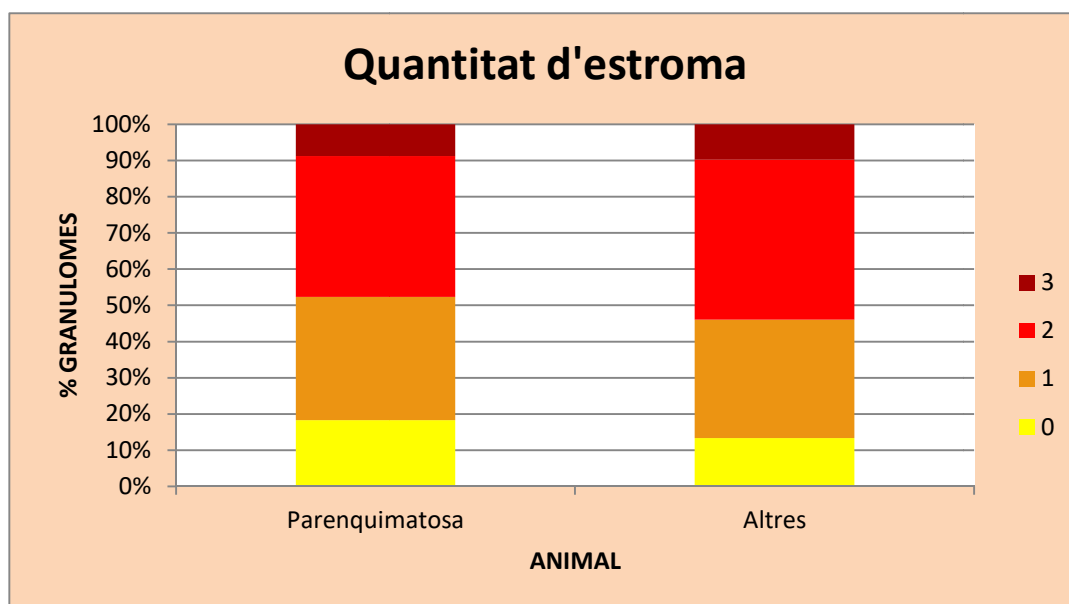


Figura 25. Percentatge de granulomes amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3), en funció de la seva localització

Al grup de BCG es va veure que la proporció de granulomes de localització parenquimatosa amb estroma 1 va ser inferior i la dels que tenien estroma 2 superior a la dels granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa. Al grup de CTRL es va veure que la proporció granulomes de localització parenquimatosa sense estroma eren superiors als de localització no exclusivament parenquimatosa, alhora que les proporcions de granulomes amb estroma 1 i 2 eren inferiors a les del

grup de granulomes “altres”. Només aquesta última diferència va ser estadísticament significativa ($Z=2,50$).

Entre grups es van trobar diferències significatives en el percentatge de granulomes de localització parenquimatosa sense estroma ($Z=3,04$) i en el de granulomes de localització parenquimatosa amb quantitat d'estroma 2 ($Z=3,10$). Els percentatges de granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa sense estroma i els dels granulomes de localització no exclusivament parenquimatosa amb estroma 1 no van tenir diferències estadísticament significatives (**Fig.26**).

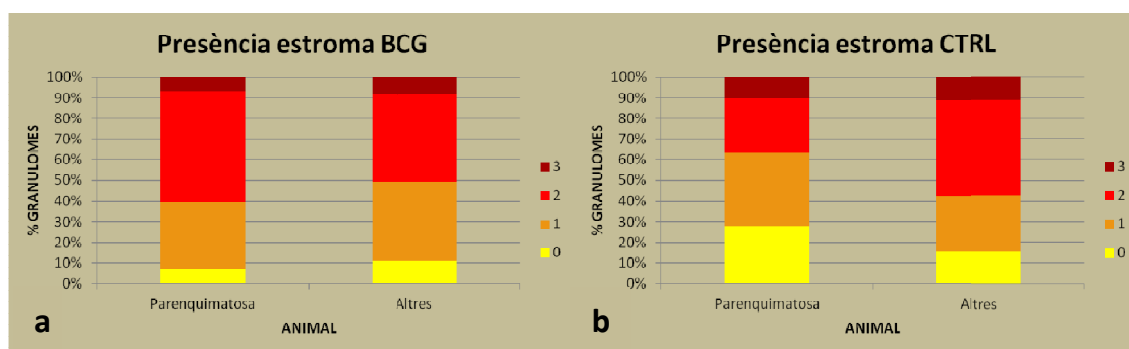


Figura 26. (a) Percentatge de granulomes d'animals BCG amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3), en funció de la seva localització. (b) Percentatge de granulomes d'animals CTRL amb quantitat d'estroma zero (0), u (1), dos (2) i tres (3), en funció de la seva localització

4.5 Discussió.

El model experimental de tuberculosi desenvolupat al CReSA demostra que la vacuna BCG funciona a l'espècie ovina, ja que redueix el volum de lesions que aquestes acaben desenvolupant. També cal dir que la vacuna no aconsegueix evitar la infecció, ja que tots els animals, vacunats i no vacunats, acaben desenvolupant un alt *nombre* de granulomes (si més no, petits) ⁶⁴. Podem dir que la BCG és una bona vacuna en tant que redueix el volum de lesions, fet que comporta un millor control de la malaltia per part dels animals i una capacitat de transmissió horitzontal reduïda per aquest mateix fet.

Donada la disponibilitat per a estudiar els pulmons d'aquest estudi fixats en formol, es va establir un nou objectiu, consistent en aprofundir el coneixement sobre els mecanismes de protecció que la vacuna confereix als animals que la reben. En aquest treball es va decidir avaluar una sèrie de granulomes de cada animal, de dues mides (menys d'1 mm de diàmetre i entre 1 i 5 mm de diàmetre) i comparar les característiques d'aquests tot agrupant-los en funció del tractament que havien rebut els animals (vacunats amb BCG o no vacunats/controls), fent èmfasi en el component fibrós de les lesions tuberculosos.

Pel que fa a les mides dels granulomes seleccionats, es va decidir finalment avaluar granulomes d'1 mm de diàmetre i granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre. La idea inicial era també incloure a l'anàlisi granulomes de més de 5 mm de diàmetre, però la observació dels talls histològics va revelar que no n'hi havia *nombre* suficient per a fer una avaluació vàlida, a més que la *n* dels animals control era molt superior a la dels BCG (que quasi no en tenien). Es va decidir triar (aleatòriament) 15 granulomes de <1 mm per animal, 90 de cada grup i 180 en total, i 10 d'entre 1 i 5 mm, 60 de cada grup i 120 en total. No va ser possible trobar 60 granulomes d'entre 1 i 5 mm de diàmetre d'animals control, quedant la *n* d'aquest grup en 51.

Pel que fa als resultats del present estudi, es van trobar diferències significatives entre grups en diferents paràmetres:

- Presència de càpsula: els animals vacunats van tenir menys granulomes d'entre 1 i 5 mm no encapsulats (18% vs. 40% dels CTRL) i més granulomes (d'ambdós grups) parcialment encapsulats (44 i 71% vs. 28 i 52% dels CTRL).

- Gruix de càpsula: els animals BCG van tenir més percentatge de granulomes d'entre 1 i 5 mm amb càpsula de gruix 1 que els CTRL (33% vs. 18%).

- Presència d'estroma: els animals vacunats van tenir menys granulomes d'1 mm sense estroma (12% vs. 36% dels CTRL) i més amb un nivell 2 d'estroma (41% vs. 20% dels CTRL)

- Localització vs. presència de càpsula: els granulomes de localització parenquimatososa van tenir major percentatge de no encapsulació (45%) que els que tenien altres localitzacions (33%).

- Localització vs. gruix de càpsula: els granulomes de localització parenquimatososa van tenir major percentatge de granulomes amb poca càpsula (gruix 0+ gruix 1) que els que tenien altres localitzacions (74% vs. 62%).

- La localització dividida en dos grups (BCG i CTRL) va evidenciar que els granulomes més encapsulats van ser els BCG de localització no exclusivament parenquimatososa, seguits dels CTRL de localització no exclusivament parenquimatososa. Els menys encapsulats, per la seva part, foren els granulomes CTRL de localització parenquimatososa, seguits dels BCG de localització parenquimatososa.

Tractament	Animal	Volum lesions TC	Càpsula (1-5 mm)	Gruix (1-5 mm)	Estroma (<1 mm)
BCG	61	+++	P/C	3/4	2/3
	56	++	P/C	1/2	0 (>20%)
	50	+	P	1/2	2/3
	57	+	P		1/2
	52	+	P	1	1/2
	51	+	A	0	0 (>20%)
Control	66	+++++++	P/C	3/4	0 (>30%)
	49	++++	A	0/1	0 (>30%)
	48	++++	P		2/3
	46	++++	A	0/1	2/3
	45	+++	P	1/2	0 (>50%)
	44	+++	A	0/1	0 (>50%)

Taula 1. Resum dels resultats més rellevants. Es caracteritzen els granulomes de cada animal: volum de lesions pulmonars, presència i gruix de càpsula fibrosa i quantitat d'estroma

Si comparem els resultats de l'estudi amb els del TC de l'estudi del model experimental, s'observen diverses coses (**Taula 1**):

-Tal i com ja hem vist a la **figura 4**, els animals BCG tenen menys volum de lesions que els CTRL. Els animals més encapsuladors de cada grup (61 i 66) són alhora els animals que més volum de lesió tenen, cosa que podria suggerir que la capacitat d'encapsular granulomes petits no és un indicador clar de protecció, si no més aviat una característica individual.

-En la mateixa línia, l'absència de càpsula en granulomes petits no correlaciona amb un volum de lesions més gran ja que els animals amb menys càpsula de cada grup (51 i 44) són els que menys volum de lesió tenen.

-En resum, els animals vacunats desenvolupen menys lesions i més càpsula que els vacunats, tot i que, tal com exemplifiquen els animals 61 i 66, el fet de tenir els granulomes molt encapsulats i amb moltes capes no garanteix una major contenció de la lesió.

-Aquesta variabilitat individual que observem en animals dels dos grups quant a la capacitat de formació de càpsula fibrosa indica que malgrat la vacunació sembla clar que pot tenir

efectes sobre la formació de fibrosi en els granulomes no és, òbviament, l'únic mecanisme per explicar per què els animals vacunats contenen millor les lesions. Com s'ha vist, la potència de la resposta immunitària cel·lular (bàsicament limfòcits Th1 i macròfags) serà determinant per a dirimir si la lesió segueix progressant o és controlada.

Quant a la càpsula, també es veu que la vacuna fa les diferències en els granulomes més grans; els percentatges de granulomes de menys d'1 mm de diàmetre amb càpsules absents, parcial o completa, així com els de gruixos de càpsula, són molt semblants entre grups, mentre que els dels granulomes d'entre 1 i 5 mm tenen diferències significatives sempre favorables als d'animals BCG, que encapsulen més i amb més capes. El fet que els granulomes grans dels animals BCG estiguin ben encapsulats faria que la lesió no progressi, mentre que la falta d'encapsulació dels granulomes grans dels animals control seria una de les causes de l'expansió i eventual confluència de les lesions.

En canvi, pel que fa a la presència d'estroma, s'han vist diferències en els granulomes més petits. Els granulomes de menys d'1 mm de diàmetre dels animals control tenen menys estroma que els dels BCG; aquest fet avalaria la primera conclusió que s'ha extret, que afirma que la BCG promou la fibrosi dels granulomes. A més, els granulomes més grans tenen, en general, més quantitat d'estroma que els petits, fet que podria explicar-se dient que el que anomenem estroma podria ser resta de càpsula, que hauria sigut superada per la lesió i per tant hauria deixat de ser-ho per passar a ser estroma.

Finalment, quant a la localització, s'observa que els granulomes que contacten amb estructures riques en fibròcits (vasos, bronquis, pleura, septe) tenen més càpsula i més gruixuda que els que estan al mig del parènquima. Una possible explicació d'aquest fet seria que els fibròcits d'aquestes estructures s'estimularien en presència de molècules que promouen la fibrosi (IL-4, IL-13, TGF- β , entre d'altres)¹⁰⁰⁻¹⁰⁴ que secreten les cèl·lules del granuloma i contribuirien a crear la càpsula.

A grans trets, els resultats de l'estudi suggereixen que la vacuna BCG promou la fibrosi dels granulomes i per tant permet als individus encapsular-los millor. L'encapsulació podria ser també un mecanisme de protecció front l'avenç de la malaltia i la dispersió de l'agent que la causa, ja que evitaria que aquest s'estengués pel pulmó o fins i tot accedís via limfàtica o sanguínia a altres parts del cos.

El fet de tenir només 6 animals per grup dificulta poder treure conclusions sobre les diferències observades. En cas que surtin animals que per raons desconegudes (genètiques, iatrogèniques, etc) tenen comportaments lluny dels que esperaríem tenint en compte el tractament que han rebut, com el 51 i el 66, pot fer que les dades quedin esbiaixades i les conclusions que s'extreguin també. El nombre de granulomes escollits per animal, que es va triar per a poder equiparar els resultats del

grup CTRL (que tenia molts granulomes de moltes mides) i del grup BCG (que en tenia pocs i petits) és limitat (15 de menys d'1 mm i 10 d'entre 1 i 5 mm) i també podria esbiaixar els resultats.

4.6 Conclusions

- Els resultats d'aquest estudi demostren que la BCG té un efecte sobre la fibrosi en la formació dels granulomes tuberculosos en el model experimental d'infecció amb *M. caprae* en ovella:
 - Els granulomes d'1 a 5 mil·límetres de diàmetre dels animals vacunats tenen més percentatge de granulomes encapsulats que els controls, i a més, amb un gruix de càpsula superior.
 - Els granulomes dels animals vacunats amb BCG desenvolupen més estroma que els dels animals control en la mida petita. Les lesions més grans (independentment de si són d'animals control o BCG) tenen més estroma que les petites.
- Pel que fa a la localització, s'observa que el fet d'estar en contacte amb estructures riques en fibròcits (vasos, bronquis, pleura, septes) ajuda al desenvolupament de la càpsula.
- Malgrat que sembla clar que la vacunació amb BCG influeix en la formació dels granulomes, també s'ha evidenciat una variabilitat individual quant a la capacitat de desenvolupar càpsula fibrosa. Aquest fet fa evident que la càpsula no és l'únic mecanisme que els animals tenen de controlar el desenvolupament de la lesió tuberculosa.

5. Agraïments

A l'IRTA-CReSA, per la oportunitat que m'ha brindat de treballar a les seves instal·lacions.

Al Mariano Domingo, per finançar la tinció de Masson, que m'ha permès desenvolupar l'estudi.

Al Bernat Pérez i a l'Ana Balseiro, per deixar-me fer servir les mostres que s'han utilitzat per a l'elaboració de l'estudi.

A la Blanca Pérez i l'Aïda Neira, tècnics de l'SDPV, per a explicar-me i fer la tinció de Masson a les mostres estudiades.

A la Mònica Pérez, tècnic de l'IRTA-CReSA, per explicar-me les tècniques d'Hematoxilina-eosina i Ziehl Neelsen.

A l'Enric Vidal, director del treball, per haver dedicat temps i esforç a l'elaboració del treball.

6. Bibliografía

1. Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, W. & Leonard, F. in *Veterinary Microbiology and microbial disease* (eds. Quinn, P., Markey, B., Carter, M., Donnelly, W. & Leonard, F.) 97 (Blackwell Science Ltd, 2002).
2. Acha, P. & Szyfres, B. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Volumen I: Bacteriosis y micosis. Tercera edición.* (Organización Panamericana de la Salud, 2001).
3. Esteban, J. & Muñoz-Egea, M.-C. Mycobacterium bovis and Other Uncommon Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
4. Gallagher, J. & Jenkins, P. A. in *Zoonoses. Biology, Clinical Practice and Public Health Control.* (eds. Palmer, S., Soulsby, Lord & Simpson, D.) 155–163 (Oxford University Press, 1998).
5. Bynum, H. *Spitting Blood. The History of Tuberculosis.* (Oxford University Press, 2012).
6. Maradona Hidalgo, J. A. *Tuberculosis. Historia de su conocimiento.* (Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, 2009).
7. Báguena Cervellera, M. J. *La tuberculosi i la seva història. An. R. Acad. Med. Comunitat Valenciana* (Fundació Uriach 1838, 1992).
8. Calmette, A. Sur La Vaccination Préventive Des Enfants Nouveau-Nés Contra La Tuberculose Par Le BCG. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **41**, 201–232 (1927).
9. WHO. *La vacuna antituberculosa.* (2008).
10. WHO. Global Health Observatory Data Repository. Tuberculosis. (2016). Available at: <http://apps.who.int/gho/data/view.main.57038ALL?lang=en>. (Accessed: 14th June 2017)
11. WHO. *Global Tuberculosis Report 2016.* (2016).
12. WHO. *Global AIDS Update 2016.* (2016).
13. WHO. *España: Perfil de tuberculosis 2015.* (2016).
14. ECDC & WHO. *Tuberculosis surveillance and monitoring in Europe in 2015.* (2017).
15. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. *Informe epidemiológico sobre la situación de la tuberculosis en España, 2014.* (2014).

16. Rodés Monegal, A., López Espinilla, M. del mar & García Lebrón, M. *INFORME ANUAL 2015. SITUACIÓ EPIDEMIOLÒGICA I TENDÈNCIA DE L'ENDÈMIA TUBERCULOSA A CATALUNYA.* (2016).
17. Hirsh, D. C. & Biberstein, E. L. in *Veterinary Microbiology.* (ed. Science, B.) 158–159 (2002).
18. OIE. in *Manual Terrestre de la OIE* (2012).
19. López, A. in *Pathologic basis of veterinary disease. Fifth edition.* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 511–518 (Mosby Elsevier, 2007).
20. Aranaz, A., Cousins, D., Mateos, A., Domínguez, L. & Lucas Domínguez, C. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. (2003). doi:10.1099/ijls.0.02532-0
21. Waters, W. R. in *Large Animal Internal Medicine. Fifth edition.* 633–636 (Mosby Elsevier, 2015).
22. Morris, R. S., Pfeiffer, D. U. & Jackson, R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. *Vet. Microbiol.* **40**, 153–177 (1994).
23. Neill, S., Neill, S. D., Bryson, D. G. & Pollock, J. M. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* **81**, 79–86 (2001).
24. Radostits, O. M., Gay, C. C. & Hinchcliff, K. W. in *Veterinary Medicine. A textbook of diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 9th edition.* 910–914 (Saunders Elsevier, 2013).
25. Domingo, M., Vidal, E. & Marco, A. Pathology of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **97**, S20–S29 (2014).
26. The Center for Food Security & Public Health. Bovine Tuberculosis. (2009).
27. El Idrissi, A. & Parker, E. Tuberculosis - Bovine tuberculosis at the animal–human–ecosystem interface. *Transbound. Anim. Dis. Bull.* **40**, 1–10 (2012).
28. EFSA, E. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA Journal* **14**, (2016).
29. Thoen, C. O., Lobue, P. A., Enarson, D. A., Kaneene, J. B. & De Kantor, I. N. Tuberculosis: a re-emerging disease in animals and humans. *Vet. Ital. Vet Ital* **45**, (2009).

30. Muñoz Mendoza, M. *et al.* Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *The Veterinary Journal* **191**, (2012).
31. Rodríguez, S. Epidemiología Molecular de *Mycobacterium bovis* y *Micobacterium caprae* en España. (Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense, 2012).
32. Sharp, J. M. in *Enfermedades de la oveja. Segunda edición.* (eds. Martin, W. & Aitken, I.) 175 (Blackwell Science Ltd, 2000).
33. C.Smith, M. & M.Sherman, D. in *Goat medicine* (eds. C.Smith, M. & M.Sherman, D.) 260 (Lea & Febiger, 1994).
34. Bezos, J. *et al.* Goats challenged with different members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex display different clinical pictures. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **167**, 185–189 (2015).
35. Muñoz-Mendoza, M. *et al.* Sheep as a Potential Source of Bovine TB: Epidemiology, Pathology and Evaluation of Diagnostic Techniques. *Transbound. Emerg. Dis.* **63**, 635–646 (2016).
36. Napp, S. *et al.* Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Vet. Rec.* (2013). doi:10.1136/vr.101347
37. Thoen, C. O. in *Zoo and Wild animal medicine. Current Therapy 3* (ed. E.Fowler, M.) 45 (WB Saunders Company, 1993).
38. Graham J. Crawshaww. in *Zoo and Wild animal medicine. Current Therapy 3* (ed. E.Fowler, M.) 135 (WB Saunders Company, 1993).
39. Taylor, S. K., Green, D. E., Wright, K. M. & Whitaker, B. R. in *Amphibian medicine and captive husbandry.* (eds. Wright, K. M. & Whitaker, B. R.) 167–168 (Krieger Publishing Company, 2001).
40. Egusa, S. in *Infectious diseases of fish.* 296 (A.A.Balkema, 1992).
41. Stoskopf, M. K. in *Fish Medicine.* (ed. Stoskopf, M. K.) 557–559 (WB Saunders Company, 1993).
42. Frye, F. L. in *Reptile Care. An atlas of disease and treatments. Volume I.* 113 (TFH Publications, INC, 1991).

43. Gavin, W. *et al.* Scientific review on Tuberculosis in wildlife in the EU. *EFSA Support. Publ.* **6**, (2009).
44. Gortázar, C. *et al.* The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mamm. Rev.* **42**, 193–206 (2012).
45. Little, T. W. A., Swan, C., Thompson, H. V & Wilesmith, J. W. Bovine tuberculosis in domestic and wild mammals in an area of Dorset. II. The badger population, its ecology and tuberculosis status. *J. Hyg., Camb* **89**, 211–224 (1982).
46. Vicente, J. *et al.* Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *107 Vet. Res* **37**, 107–119 (2006).
47. Mentaberre, G. *et al.* Long-Term Assessment of Wild Boar Harvesting and Cattle Removal for Bovine Tuberculosis Control in Free Ranging Populations. *PLoS One* **9**, e88824 (2014).
48. Pérez de Val, B. *et al.* Serological Follow-up of Tuberculosis in a Wild Boar Population in Contact with Infected Cattle. *Transbound. Emerg. Dis.* **64**, 275–283 (2017).
49. Gortázar, C. *et al.* Bovine Tuberculosis in Doñana Biosphere Reserve: The Role of Wild Ungulates as Disease Reservoirs in the Last Iberian Lynx Strongholds. *PLoS One* **3**, e2776 (2008).
50. Santos, N. *et al.* Epidemiology of Mycobacterium bovis infection in wild boar (Sus scrofa) from Portugal. *J. Wildl. Dis.* **45**, 1048–1061 (2009).
51. VISAVET. Universidad Complutense de Madrid. Realización de las pruebas de intradermotuberculinización y gamma-interferón. (2015). Available at: http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manual_intradermotuberculinizacion_tcm7-428822.pdf. (Accessed: 18th February 2017)
52. Álvarez Sánchez, J. *et al.* Evaluación de las medidas incorporadas en el programa de erradicación de la Tuberculosis Bovina de Castilla y León. (2009).
53. Male, D., Brostoff, J., Roth, D. B. & Roitt, I. in *Inmunología. Séptima edición.* 477–491 (Mosby Elsevier, 2007).
54. Bezos Garrido, J. Tuberculosis caprina: Estudio de la respuesta inmune y aportaciones a su diagnóstico. (Departamento de Sanidad Animal. Facultad de Veterinaria. Universidad

Complutense, 2011).

55. Gelberg, H. B. in *Pathologic basis of veterinary disease. Fifth Edition.* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 385–387 (Mosby Elsevier, 2007).
56. Andrews, A. H., Blowey, R. W., Eddy, R. G. & Boyd, H. *Bovine Medicine. Diseases and husbandry of cattle. Second Edition.* (Blackwell Science, 2004).
57. Sweeney, R. W. in *Large Animal Internal Medicine. Fifth edition.* 834 (Mosby Elsevier, 2015).
58. Fentahun, T. & Luke, G. Diagnostic Techniques of Bovine Tuberculosis: A Review. *African J. Basic Appl. Sci.* **4**, 192–199 (2012).
59. Bezos, J. *et al.* Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res. Vet. Sci.* **97**, S44–S52 (2014).
60. Plackett, P. *et al.* An ELISA for the detection of anergic tuberculous cattle. *Aust. Vet. J.* **66**, 15–19 (1989).
61. Strain, S. A. J., McNair, J. & McDowell, S. W. J. Bovine tuberculosis: a review of diagnostic tests for *M. bovis* infection in badgers. (2011).
62. Gutiérrez, M., Tellechea, J. & García Marín, J. F. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Vet. Microbiol.* **62**, 281–90 (1998).
63. Lahuerta-Marin, A. *et al.* Should they stay, or should they go? Relative future risk of bovine tuberculosis for interferon-gamma test-positive cattle left on farms. *Vet. Res.* **46**, 90 (2015).
64. Balseiro, A. *et al.* Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep. *PLoS One* **12**, e0180546 (2017).
65. Garcia-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J. & Allepuz, A. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). *Prev. Vet. Med.* **121**, 332–337 (2015).
66. Vidal, E. *et al.* Six-Year Follow-up of Slaughterhouse Surveillance (2008-2013): The Catalan Slaughterhouse Support Network (SESC). *Vet. Pathol.* **53**, 532–544 (2016).
67. VISAVET & MAPAMA. Toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico y diagnóstico de tuberculosis. (2017). Available at:

http://www.mapama.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manual_procedimiento_muestras_2017_tcm7-428824.pdf. (Accessed: 27th July 2017)

68. Moreno, B. *Higiene e inspección de carnes. Volumen II. Bases científicas y legales de los dictámenes de matadero*. (Ediciones Díaz de Santos, 2003).
69. Cullen, J. M. & Brown, D. L. *Pathologic basis of veterinary disease. Fifth edition. Chapter 8. Hepatobiliary System and Exocrine Pancreas*. (Mosby Elsevier, 2007).
70. Grist, A. in *Bovine meat inspection. Anatomy, physiology and disease conditions. Section 224* (Nottingham University Press., 2005).
71. Marcato, P. S. in *Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos*. 259, 273 (255–274) (McGraw Hill Interamericana, 1990).
72. Marcato, P. S. in *Anatomía e histología patológica especial de los mamíferos domésticos*. 123,126 (89-126) (McGraw Hill Interamericana, 1990).
73. López, A. in *Thomson's Special Veterinary Pathology. Third Edition*. (eds. McGavin, M. D., Carlton, W. W. & Zachary, J. F.) 170–171 (Mosby Elsevier, 2001).
74. Caswell, J. L. & Williams, K. J. in *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of domestic animals. Fifth Edition. Volume 2*. (eds. Barker, D. C. et al.) 609 (Elsevier Saunders, 2007).
75. Kohli, R., Punia, R. S., Kaushik, R., Kundu, R. & Mohan, H. Relative value of immunohistochemistry in detection of mycobacterial antigen in suspected cases of tuberculosis in tissue sections. *Indian J. Pathol. Microbiol.* **57**, 574–8 (2014).
76. Cousins, D. V, Francis, B. R. & Gow, B. L. Advantages of a new agar medium in the primary isolation of Mycobacterium bovis. *Vet. Microbiol.* **20**, 89–95 (1989).
77. Perez de Val, B. *et al.* Experimental Model of Tuberculosis in the Domestic Goat after Endobronchial Infection with Mycobacterium caprae. *Clin. Vaccine Immunol.* **18**, 1872–1881 (2011).
78. Murray, J. F., Schraufnagel, D. E. & Hopewell, P. C. Treatment of tuberculosis: A historical perspective. *Ann. Am. Thorac. Soc.* **12**, 1749–1759 (2015).
79. Keshavjee, S. & Farmer, P. E. Tuberculosis, Drug Resistance, and the History of Modern

- Medicine. *N Engl J Med* **10367**, 931–6 (2012).
80. Juan Bautista Gutiérrez-Aroca, Pilar Ruiz & Manuel Casal. Resistencias a fármacos en *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Esp Quim.* ;**26(4)**, 332–336 (2013).
 81. CDC, C. for disease control and prevention. TB Elimination: Extensively Drug-Resistant Tuberculosis (XDR-TB). *New Lett.* 1–3 (2013).
 82. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. *Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2017.* (2017).
 83. Philips, J. A. & Ernst, J. D. Tuberculosis Pathogenesis and Immunity. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis* **7**, 353–84 (2012).
 84. García, M. C. Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* **14**, 114–128 (2001).
 85. Sell, S. in *Immunology, immunopathology and immunity. Sixth edition.* 446–448 (American Society of Microbiology Press, 2001).
 86. Marzo Escartín, E. Tuberculosis pulmonar: com evitar el pas de granuloma a cavitat. Estudi de la inflamació en la patogènesi de la malaltia tuberculosa i desenvolupament de noves estratègies terapèutiques. *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)* (2014).
 87. Sell, S. in *Immunology, immunopathology and immunity. Sixth Edition.* 456–457 (American Society of Microbiology Press, 2001).
 88. McAdam, A. J. & Sharpe, A. H. in *Patología estructural y funcional. Séptima edición. Capítulo 8.* (eds. Cotran, R. S., Kumar, V. & Collins, T.) 385–390 (Elsevier Saunders, 2005).
 89. Lyadova, I. in *Understanding Tuberculosis - Analyzing the Origin of Mycobacterium Tuberculosis Pathogenicity* (InTech, 2012). doi:10.5772/32060
 90. Snyder, P. W. in *Pathologic basis of veterinary disease. Fifth edition.* (eds. McGavin, M. D. & Zachary, J. F.) 266–270 (242–288) (Elsevier, 2007).
 91. Roach, D. R. *et al.* TNF Regulates Chemokine Induction Essential for Cell Recruitment, Granuloma Formation, and Clearance of Mycobacterial Infection. *J. Immunol.* **168**, (2002).
 92. van Crevel, Reinout; Ottenhoff, Tom H.M.; van der Meer, J. W. M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev. Am. Soc. Microbiol.* 294–309 (2002).

93. Russell, D. G., Cardona, P.-J., Kim, M.-J., Allain, S. & Altare, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat. Immunol.* **10**, 943–8 (2009).
94. O 'garra, A. *et al.* The Immune Response in Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol* **4**, 475–527 (2013).
95. Tizard, I. R. in *Inmunología Veterinaria. Sexta edición*. 375 (McGraw Hill Interamericana, 2002).
96. Lozano, J. A. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. *Offarm* **Vol.21**, 102–110 (2002).
97. Grosset, J. Mycobacterium tuberculosis in the extracellular compartment: an underestimated adversary. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 833–6 (2003).
98. Flynn, J. L. & Chan, J. IMMUNOLOGY OF TUBERCULOSIS. *Annu. Rev. Immunol* **19**, 93–129 (2001).
99. Flynn, J. L. & Chan, J. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* **69**, 4195–201 (2001).
100. Lupher, M. L. & Gallatin, W. M. Regulation of Fibrosis by the Immune System. 245–288 (2006). doi:10.1016/S0065-2776(05)89006-6
101. Khalil, N., Corne, S., Whitman, C. & Yacyshyn, H. Plasmin regulates the activation of cell-associated latent TGF-beta 1 secreted by rat alveolar macrophages after in vivo bleomycin injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **15**, 252–259 (1996).
102. Bissell, D. M., Wang, S. S., Jarnagin, W. R. & Roll, F. J. Cell-specific expression of transforming growth factor-beta in rat liver. Evidence for autocrine regulation of hepatocyte proliferation. *J. Clin. Invest.* **96**, 447–455 (1995).
103. Letterio, J. J. & Roberts, A. B. REGULATION OF IMMUNE RESPONSES BY TGF- β . *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 137–161 (1998).
104. Wynn, T. A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* **4**, 583–94 (2004).